



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CONSTRUCCION DE RIBOSONDAS PARA LA DETECCION DE
SECUENCIAS DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA,
POLIOVIRUS Y VIRUS DEL DENGUE.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRIA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)

P R E S E N T A

Ana Lorena Gutierrez Escolano.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	I
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	5
OBJETIVOS.....	28
METODOLOGIA.....	29
CONSTRUCCION DE RIBOSONDAS.....	29
Ensayos de restricción de DNA plasmídico.....	29
Preparación de geles de agarosa.....	29
Electroforésis y tinción de DNA en geles de agarosa.....	29
Obtención de fragmentos de DNA mediante el método de agarosa de bajo punto de fusión.....	30
Extracción fenólica.....	31
Clonación.....	31
Transformación bacteriana (competencia y transformación celular).....	32
PROPAGACION DEL PLASMIDO.....	33
Minipreparación de DNA.....	33
Maxipreparación con el método de cloruro de cesio.....	34
SINTESIS DE RIBOSONDAS.....	36
Transcripción "in vitro" en presencia de isótopos radiactivos.....	36
EXTRACCION DEL RNA DE CELULAS INFECTADAS Y NO INFECTADAS...	37
Extracción de RNA citoplásmico.....	37
Extracción de RNA mediante el método de isotiocianato de guanidina (ITCG).....	38

Diseño y construcción de los plásmidos con secuencias del virus de la poliomielitis.....	66
Síntesis de la ribosonda a partir del plásmido pGEM4Z-VP2...	69
Detección de secuencias genómicas del virus de la poliomielitis mediante el uso de ribosondas.....	70
Diseño y construcción de los plásmidos con secuencias del virus del Dengue.....	72
Síntesis de la ribosonda del virus del dengue a partir del plásmido pGEM-30.....	75
Detección de secuencias del virus del dengue mediante el uso de ribosondas.....	77
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	84
Diseño y construcción de los plásmidos con las secuencias del VIH 1, poliovirus y virus del dengue.....	84
Detección de secuencias del VIH 1 mediante el uso de ribosondas.....	86
Detección de secuencias del virus de la poliomielitis mediante el uso de ribosondas.....	91
Detección de secuencias del virus del dengue mediante el uso de ribosondas.....	93
CONCLUSIONES.....	97
APENDICE.....	101
BIBLIOGRAFIA.....	104

FIGURA 1.-	RESTRICCION DEL PLASMIDO pBH10.....	51
FIGURA 2.-	ESQUEMA DE CONSTRUCCION DEL PLASMIDO pBH4.3.....	52
FIGURA 3.-	MAPEO POR RESTRICCION DEL PLASMIDO pBH4.3.....	53
FIGURA 4.-	TRANSCRIPCION "IN VITRO" DEL PLASMIDO pBH4.3...	55
FIGURA 5.-	HIBRIDACION TIPO FRANJA DEL RNA DE CELULAS INFECTADAS CON EL VIH.....	59
FIGURA 6.-	HIBRIDACION TIPO FRANJA DE RNA DE CELULAS INFECTADAS CON EL VIH 1 (HTLV IIIb Y MN).....	61
FIGURA 7.-	HIBRIDACION TIPO FRANJA DE RNA POLI A+ Y POLI A- DE CELULAS INFECTADAS CON EL VIH 1.....	63
FIGURA 8.-	TRANSFERENCIA TIPO NORTHERN DE LAS POBLACIONES DE RNA DEL VIH 1.....	65
FIGURA 9.-	HIBRIDACION TIPO FRANJA DE RNA POLI A+ OBTENIDO DE CELULAS INFECTADAS CON EL VIH 1.....	67
FIGURA 10.-	TRANSCRIPCION "IN VITRO" DEL PLASMIDO pGEM4Z-VP2.....	68
FIGURA 11.-	HIBRIDACION TIPO FRANJA DE RNA DE CELULAS INFECTADAS CON EL VIRUS DE LA POLIOMIOELITIS...	71
FIGURA 12.-	TRANSFERENCIA TIPO NORTHERN DE POBLACION DE RNA DEL VIRUS DE LA POLIOMIELITIS.....	73
FIGURA 13.-	RESTRICCION DEL PLASMIDO pGEM 30c.....	74
FIGURA 14.-	TRANSCRIPCION "IN VITRO" DEL PLASMIDO pGEM 30c..	76
FIGURA 15.-	HIBRIDACION TIPO FRANJA DE RNA DE CELULAS INFECTADAS CON EL VIRUS DEL DENGUE SEROTIPO 4...	78
FIGURA 16.-	MAPEO POR RESTRICCION DEL PLASMIDO pDE.....	82
FIGURA 17.-	HIBRIDACION TIPO FRANJA DE RNA DE CELULAS INFECTADAS CON EL VIRUS DEL DENGUE SEROTIPO 4...	83
FIGURA 18.-	HIBRIDACION TIPO NORTHERN DE LAS POBLACIONES DE RNA DEL VIRUS DEL DENGUE.....	80
FIGURA A.-	FAMILIAS DE VIRUS QUE INFECTAN VERTEBRADOS.....	

FIGURA B.-	REPLICACION DE ALGUNOS VIRUS DE RNA DE CADENA POSITIVA.....	10
FIGURA C.-	ENSAYO INMUNOABSORBENTE UNIDO A ENZIMA (ELISA)..	21
FIGURA D.-	REGULACION DE LA EXPRESION GENICA DEL VIH.....	57

RESUMEN

Los virus constituyen el grupo de agentes patógenos que más infecciones causan al hombre, por lo que son un problema importante de salud pública a nivel mundial.

Entre los virus, aquellos cuyo genoma es RNA representan un problema adicional debido a su alta incidencia y a los pocos métodos disponibles para su control. Un ejemplo de ello son el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) causante del Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), el virus del dengue, el virus de la poliomielitis, el virus del resfriado común, el virus del sarampión, etc.

La mejor manera de controlar la diseminación de este tipo de enfermedades es la prevención; sin embargo, una vez establecida la infección es el diagnóstico el que representa un papel crucial en la reducción de la propagación de una enfermedad determinada.

Los métodos de diagnóstico más comúnmente empleados hasta el momento son del tipo inmunológico (Inmunofluorescencia, Radioinmunoensayo, Ensayo radioinmunoabsorbente, Ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA), inmunotransferencia, etc.) que a pesar de ser muy precisos tienen como inconveniente una baja sensibilidad de detección en las etapas tempranas de una infección debido a la poca cantidad de anticuerpos circulantes contra un virus determinado.

Otra de las metodologías de diagnóstico utilizadas hoy en día es la detección de secuencias genómicas a través de la hibridación con moléculas (sondas) de DNA y RNA, que tiene una alta sensibilidad, especificidad y rapidéz. Las sondas de RNA (ribosondas) tienen la ventaja adicional de producirse en mayor cantidad y presentar una alta actividad específica.

En este trabajo, se analizó el uso de ribosondas (secuencias de RNA obtenidas a partir de DNA recombinante que son capaces de detectar por complementaridad la presencia de secuencias virales) como una alternativa de diagnóstico temprano para los virus de la poliomielitis, del dengue y el VIH.

La estrategia experimental consistió de manera general en la subclonación de secuencias correspondientes a los tres virus en un vector de clonación, y mediante ensayos de transcripción "in vitro" en presencia de α -³²P-UTP generar una ribosonda capaz de detectar secuencias virales específicas en extractos celulares infectados.

Para la detección de secuencias del VIH, la ribosonda utilizada fue sintetizada a partir del plásmido pBH.4.3 previamente digerido con la enzima Eco RV. La ribosonda de un tamaño de 378b, fue capaz de detectar específicamente secuencias del VIH 1 en muestras de RNA total proveniente de células molt infectadas con el VIH 1 (HTLV IIIb), y no así en muestras de RNA total de células no infectadas. Sin embargo, en estas últimas se presentó una leve hibridación cruzada con secuencias del RNA ribosomal 28 S y 18 S.

La población de RNA poli A+, fue separada e hibridada, obteniéndose una señal clara y específica con las muestras

provenientes de células infectadas, y no así con las muestras provenientes de células no infectadas.

Para la detección de secuencias del virus de la poliomiелitis, la ribosonda utilizada fue obtenida a partir del plásmido pGEM4Z-VP2 cortado con la enzima Sca I. La ribosonda presentó un tamaño de 221b y fue capaz de detectar específicamente secuencias del virus de la poliomiелitis en muestras de RNA total obtenidas mediante 5 diferentes metodologías, mucho más sencillas que las utilizadas en la detección de secuencias del VIH.

En el caso de la detección del virus del dengue fueron construidas dos ribosondas. La primera fue obtenida a partir de la restricción del plásmido pGEM 30 con la enzima Stu I. La ribosonda presentó 1134b y fue capaz de detectar secuencias del virus del dengue, pero esta misma presentó hibridación cruzada con secuencias del RNA ribosomal.

La ausencia de una región poliadenilada en el RNA mensajero del virus del dengue nos obligó a buscar una estrategia diferente a la utilizada en el caso del VIH para eliminar la hibridación cruzada. Para ello, se decidió construir una ribosonda más pequeña, sintetizada a partir del plásmido pDE restringido con la enzima Hinc II, con un tamaño de 314b.

Los resultados con esta segunda ribosonda fueron similares a los anteriores, y aunque la ribosonda fue capaz de detectar las secuencias del virus del dengue, consideramos que será necesario acoplar esta metodología con un sistema que separe o amplifique las secuencias virales para poder diferenciarlas con claridad de las

hibridaciones con las secuencias celulares.

En la detección del VIH, las ribosondas pueden ser utilizadas como un método confirmatorio a pesar de requerirse de técnicas sofisticadas y laboratorios especializados (como ocurre con las pruebas de inmunotransferencia (Western Blot). En el caso del virus de la poliomielitis, las ribosondas pueden ser utilizadas en la detección de secuencias virales de extractos celulares de manera rápida y muy sencilla, y en el caso de la detección del virus del dengue es necesario acoplar otro tipo de metodologías como la amplificación de secuencias virales (reacción en cadena de la polimerasa, o PCR) para obtener un buen resultado con esta metodología.

INTRODUCCION

Los virus constituyen el grupo de agentes patógenos que más infecciones causan al hombre. Se estima que más de 400 virus diferentes son capaces de infectar al humano, causando uno o varios tipos de infección, que puede involucrar a más de un organo y variar de leve a severa, fulminante y mortal (Mendell, G.L. y cols. 1979).

Los factores que influyen en el establecimiento y gravedad de una infección dependen tanto del tipo de virus como del propio organismo, en donde la edad, estado general de salud, via de entrada, tipo de virus, etc. son determinantes (Evans, A. 1976.; Fields, B.N. y Knipe, D.M. 1990).

Desde diferentes puntos de vista, las manifestaciones de las infecciones virales son muy vastas y variables. En el aspecto clínico, pueden observarse síntomas gastrointestinales, neurológicos, cardíacos, inmunológicos y respiratorios; infecciones crónicas como la hepatitis y el herpes genital, infecciones de secuela permanente, como la encefalitis y la poliomielitis e incluso enfermedades con una alta incidencia de morbilidad como el caso de la infección por el virus del dengue, fiebre amarilla, rabia y virus de inmunodeficiencia humana (VIH) agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Evans, A. 1976.; Greene, W.C. 1991).

En el aspecto epidemiológico, muchas infecciones tienen una

amplia distribución en todo el mundo, como lo son las provocadas por el virus del resfriado común (Cajero, M. 1992) mientras que otras se limitan a localidades geográficas específicas, como algunas fiebres hemorrágicas y encefalitis (Monath, T.P. 1990).

La adquisición y transmisión de las enfermedades virales puede ocurrir de diferentes maneras: en forma de aerosoles (como la influenza y sarampión) (Tyler, K.L. y Fields, B.N. 1990), a través de la ruta fecal-oral, (como la poliomielitis y la hepatitis A) (Almond, J.W. 1987; Kools, A.M. 1992, Ross, B.C., y cols 1991.), por contacto personal a través de fuentes como la comida o la bebida, contacto sexual (que incluye infecciones provocadas por el virus del herpes, citomegalovirus, papilomavirus y el VIH (Abbas, A.K. y cols. 1991; Tyler, K.L. y Fields, B.N. 1990;)), por contacto con animales (como la rabia y el dengue) (Fenner, F. y White, D. 1974) e incluso de manera congénita (como la rubéola y algunas infecciones por citomegalovirus) (Halstead, S.B. 1988; Fenner, F. y White, D. 1974).

Cuando un virus ha penetrado en el organismo puede permanecer por largos periodos dentro de él, diseminándose en éste por la vía nerviosa, (como el virus de la rabia, herpes zoster, etc.) o por la vía linfática o sanguínea (Tyler, K.L. y Fields, B.N. 1990).

Una vez que la infección se ha establecido, un virus es capaz de provocar una gran diversidad de respuestas del mismo hospedero que en muchos casos contribuyen al desarrollo de la enfermedad. Como hemos señalado, existe una enorme diversidad en la naturaleza de lo que puede ocurrir después de que un determinado virus ha

FAMILIAS DE VIRUS QUE INFECTAN VERTEBRADOS


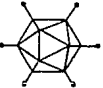
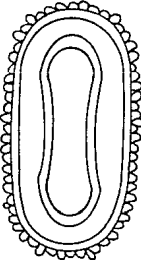




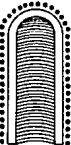







SIN ENVOLTURA		CON ENVOLTURA	
<p>ds DNA</p>  <p><i>Iridoviridae</i> (Típula Iridescent)</p>  <p><i>Adenoviridae</i> (Adenovirus Humano 2)</p>	<p>ds DNA</p>  <p><i>Poxviridae</i> (Vaccinia)</p>  <p><i>Herpesviridae</i> (Herpes Simplex)</p>		
<p>ds RNA</p>  <p><i>Papovaviridae</i> (Papiloma)</p>	<p>ss RNA</p>  <p><i>Paramyxoviridae</i> (Sarampión)</p>  <p><i>Orthomyxoviridae</i> (Influenza)</p>  <p><i>Rhabdoviridae</i> (Estomatitis Vesicular)</p>  <p><i>Retroviridae</i> (Sarcoma de Rous)</p>		
<p>ss RNA</p>  <p><i>Caliciviridae</i> <i>Picornaviridae</i> (Exantema Vesicular) (Polivirus Humano)</p>  <p><i>Bunyaviridae</i> (Bunyamwra)</p>  <p><i>Togaviridae</i> (Sindbis)</p>	<p>ss DNA</p>  <p><i>Parvoviridae</i> (Kit hom Rat)</p>  <p><i>Arteriviridae</i> (Coronavirus Linfocítico)</p>  <p><i>Coronaviridae</i> (Bronquitis de Ave)</p>		

FIGURA A.

características fisicoquímicas (Matthews, F.E. 1982).

Cuando los virus cuyo material genético es RNA infectan a una célula, ocurren cambios muy drásticos en ella, debido a que traen consigo un tipo de sistema genético que los hace no solo capaces de modificar las funciones celulares para su beneficio sino que les confiere la característica estrictamente viral, de poder replicar su propio RNA; es decir, biosintetizar moléculas de RNA a partir de un molde de RNA. Este evento, no ocurre normalmente en las células no infectadas, en donde la síntesis de las moléculas de RNA se lleva a cabo a partir de moléculas de DNA complementario celular (Goodheart, C. 1969.; Richards, O.C. y Enrenfeld, E. 1990). Los virus de RNA introducen estas nuevas funciones con la finalidad de que su RNA genómico pueda autorreplicarse, lo que puede ocurrir mediante diferentes mecanismos dependiendo del virus de RNA que se trate.

Los virus del dengue, poliomiélitis y el VIH, tienen como material genético una molécula de RNA_{cs} y polaridad positiva (+) (ya que se trata de una cadena homóloga a la del RNA mensajero) (Rice, Ch.M. y cols. 1986). A pesar de ello, estos virus siguen diferentes estrategias para replicarse dentro de la célula. Los dos primeros son capaces de sintetizar a partir de un RNA genómico una molécula de RNA_{cs} y polaridad negativa (-) que a su vez es utilizada como molde para sintetizar las moléculas de RNA mensajero viral (mediante la acción de una enzima RNA polimerasa dependiente de RNA). El VIH sigue una vía de replicación más complicada, que consiste en la formación de una molécula de DNA dc a partir del RNA

genómico, (mediante la acción de la enzima transcriptasa reversa) capaz de integrarse en el genoma celular en forma de provirus, en donde se transcribe de manera similar a lo que ocurre normalmente con los genes celulares, dando lugar a los distintos RNAs mensajeros virales y por lo tanto al virión (FIGURA B) (Camarena, L. y col. 1987).

Los virus de RNA son capaces de producir una gran cantidad de enfermedades en diferentes grupos de seres vivos, desde las bacterias, que pueden ser infectadas por los fagos MS2, R17 y F1, hasta las plantas superiores en donde casi el total de los virus que las infectan son de RNA (Goodheart, C. 1969). En los animales, y específicamente en el humano, los virus de RNA son capaces de producir enfermedades muy graves que pueden provocar desórdenes virulentos e incluso fatales, como lo son el SIDA, la fiebre amarilla, fiebre del dengue y la poliomiелitis (Henchal, E.A. 1991.; Martinez, A.C. 1988.; Melnick, V.L. 1983).

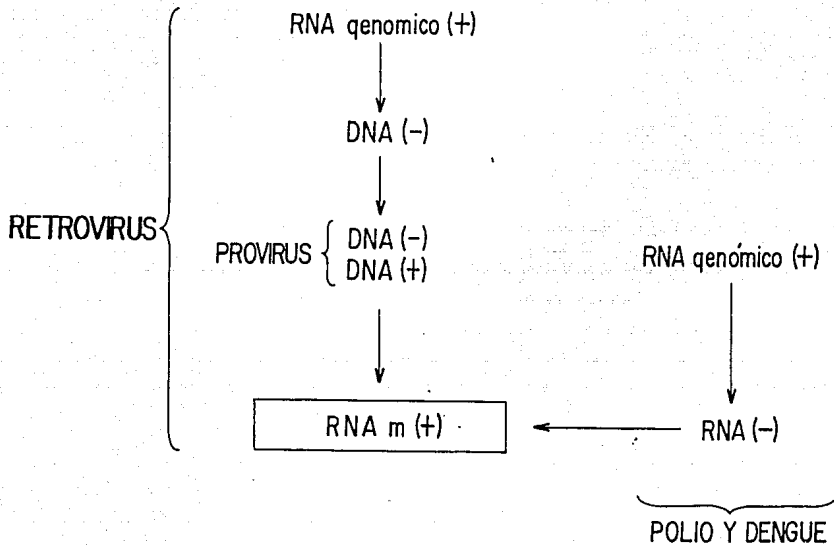


FIGURA B.-REPLICACION DE ALGUNOS VIRUS DE RNA DE CADENA POSITIVA.

En la replicación de los retrovirus, las moléculas de RNA genómico sirven de molde para la formación de una molécula de DNA de doble cadena mediante una enzima viral, la DNA polimerasa dependiente de RNA (retrotranscriptasa). Este DNA de doble cadena se integra en el genoma celular en forma de provirion y se replica de igual manera que los genes celulares dando origen a las moléculas de RNA mensajero viral. La replicación del poliovirus y del virus del dengue ocurre de manera similar; las moléculas de RNA genómico son utilizadas como molde para la formación de moléculas de RNA de cadena negativa que a su vez sirven de molde para la formación de las moléculas de RNA mensajero viral.

POLIOMIELITIS

La poliomielitis es una enfermedad aguda del sistema nervioso central (SNC) de humanos. Desde el siglo pasado, representa un problema grave de salud pública y continúa siendolo a pesar del desarrollo de vacunas tanto inactivas como atenuadas. En algunos países desarrollados es considerada como una enfermedad controlada, pero en la mayoría de los países tropicales y áreas en desarrollo (que representan más de la mitad de la población mundial) se presenta todavía en gran proporción, debido a las condiciones poco salubres que en algunos de ellos se presentan favoreciendo la transmisión de la misma a través de la ruta fecal-oral (Melnick, J.L. 1983).

El virus de la poliomielitis pertenece a la familia de los picornavirus. Presenta una simetría icosaédrica con una cápside de aproximadamente 22 a 30 nm de diámetro y carece de envoltura (Stanway, G. 1990).

La cápside se encuentra formada por aproximadamente 60 copias de 4 proteínas: Vp1, Vp2, Vp3 y Vp4 las cuales se encuentran rodeando a una cadena de RNA genómico de (cs) y (+) de 7.5 Kb de longitud. El extremo 5' terminal del genoma se encuentra unido a una pequeña proteína de origen viral llamada Vpg, mientras que el extremo 3' terminal se encuentra poliadenilado (Lawson, A. y Semler, B.L. 1990).

En el extremo 5' terminal, se encuentra una región no

traducida de 742 nucleótidos, seguida de otra región de marco de lectura abierto único, de 6600 nucleótidos que continúa en una región de 72 nucleótidos (no traducida) en el extremo 3' terminal de la cadena (Wimmer, E. y cols. 1987).

El marco de lectura abierto del RNAm, que es idéntico al genómico a excepción de que carece de la proteína Vpg, codifica para una sola poliproteína que es procesada proteolíticamente en numerosos sitios para dar origen a la formación de las proteínas virales maduras.

Las proteínas de la cápside se encuentran localizadas en el extremo aminoterminal de la poliproteína (región P1) mientras que las proteínas de replicación se encuentran hacia el extremo carboxilo (p3).

El virus de la poliomiелitis, es uno de los virus de animales de crecimiento más rápido y productivo. Su ciclo se completa en 6 o 7 horas, durante las cuales un simple virión es capaz de dar origen a 100,000 virus por célula infectada. A pesar de que la infección suele producir síntomas de fiebre, malestar, sueño, cefalea, náuseas, vómito y solo en raras ocasiones causa la parálisis (e incluso la muerte del individuo), la poliomiелitis representa un grave problema en lo que se refiere a salud pública.

DENGUE

Otra de las enfermedades producidas por virus de RNA, es la llamada fiebre del dengue. El primer reporte de dicha enfermedad ocurrió en los años 20s, durante los cuales fue definida la existencia de múltiples serotipos (D1, D2, D3 y D4) (Russell, P. 1973.; Monath, T.P. 1990).

La enfermedad suele manifestarse de dos diferentes maneras, la primera, involucra un síndrome clásico poco grave que produce fiebre, salpullido y dolor muscular, mientras que la segunda se presenta en forma mucho más severa, denominándose fiebre hemorrágica de dengue, (FDH), con manifestaciones hemorrágicas que han causado epidemias en el sureste asiático, Africa, Islas del Pacífico y América, provocando la muerte en cerca del 10% de quienes la padecen (Mendell, G.L. y cols. 1979.; Pinheiro, F. 1989).

El virus del dengue, pertenece a la familia de los Flavivirus, con un tamaño de 35 a 45 nm de diámetro. Consiste de una nucleocápside rodeada de una envoltura lipoprotéica en donde se ubican dos proteínas virales embebidas en una bicapa lipídica (Halstead, S.B. 1989).

La transmisión del virus a humanos, es a través de la picadura de la hembra hematófaga del mosquito, Aedes sp y es debido a su gran capacidad de adaptación a diferentes condiciones climatológicas que ha podido difundirse en las distintas áreas geográficas del mundo

(Halstead, S.B., 1989.; Monath, T.P. 1990).

La evidencia experimental sugiere que el virus del dengue infecta células mononucleares en organismos vivos, aunque "in vitro" se ha podido replicar en monocitos y otros tipos celulares (Halstead, S.B. 1977).

El genoma del virus del dengue está compuesto de una sola molécula de RNA de (cs) (+), con un tamaño aproximado de 10.6 Kb. El extremo 5' terminal de la molécula presenta la estructura de "cap" (o residuo de guanina metilada en la posición 7), mientras que el extremo 3' terminal carece del segmento de poli A (cuya presencia se ha reportado en la mayoría de los RNA mensajeros de los organismos eucarióticos) (Schleisinger, 1990. Wingler, G. y Wingler, G. 1981).

El RNAm codifica para las proteínas estructurales y no estructurales. La traducción del RNAm del virus del dengue, al igual que la del poliovirus, genera una poliproteína que es procesada por proteasas celulares y virales para dar origen a las proteínas virales maduras. Se ha propuesto que las proteínas estructurales de los flavivirus, localizadas en el extremo aminoterminal, son procesadas por proteasas celulares (Proteínas C, PrM y E) en tanto que en la maduración de los péptidos no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4 y NS5) participan proteasas codificadas por el propio virus (Halstead, S.B. 1988).

El aspecto clínico de esta enfermedad varía desde un cuadro febril (dengue clásico o infección primaria) hasta las formas graves que pueden manifestarse como FDH o como síndrome de choque

por dengue (SCD) (Halstead, S.B. 1989.; Ramos, C. 1989). La hipótesis para explicar estas formas graves de la enfermedad van desde una variación antigénica viral que provoca que el virus presente diferentes grados de virulencia, hasta la propuesta por Healsted, que sostiene que la existencia previa de anticuerpos (infección primaria) contra un serotipo determinado y la siguiente reinfección con otro serotipo diferente (infección heteróloga) dentro de un tiempo determinado, son las condiciones necesarias para que se presente el SCD o FHD. Esta última propuesta sugiere que los anticuerpos IgG preformados no neutralizantes forman un complejo anticuerpo-virus, que facilita la unión y consecuente infección de los monocitos (Halstead, S.B. 1988), lo que permite a su vez una amplificación progresiva de la replicación viral en ellos. Todo esto, provoca desórdenes fisiológicos agudos, como el aumento en la permeabilidad vascular e inflamación, pérdida de plasma, hipertensión etc., lo que a su vez ha provocado un gran número de muertes en todo el mundo, tanto de niños como de adultos (Ramos, C. 1989).

SINDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA

Otra enfermedad producida por virus de RNA que está causando un gran número de muertes en todo el mundo, es el SIDA. Este síndrome, fue por primera vez descrito a principios de la década de los 80s, y se caracteriza por provocar una profunda inmunosupresión con diversas manifestaciones clínicas, que tienen como consecuencia

el establecimiento de enfermedades oportunistas, malignas y degeneración del sistema nervioso central (SNC) (Greene, W.C. 1991.; Abbas, A.K. y cols. 1991).

El SIDA es uno de los síndromes clínicos causados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) perteneciente a la familia de los retrovirus, subfamilia de los lentivirus, que infecta primariamente a las células T con receptores CD4 y a macrófagos aunque también es capaz de infectar diferentes tipos celulares del SNC (Greene, W.C. 1991.; Abbas, A.K. y cols. 1991).

El VIH se caracteriza por provocar tanto una infección latente de las células a largo plazo, como una infección con efectos citopáticos a corto plazo, produciéndose en ambos casos, una enfermedad de progresión lenta y fatal (Greene, W.C. 1991.; Abbas, A.K. y cols. 1991).

Se han identificado 2 serotipos de VIH cercanamente relacionados, el VIH 1 y el VIH 2 que aunque presentan diferencias genotípicas, causan indistinguiblemente el SIDA.

Una partícula infectiva de VIH posee 2 cadenas de RNA de cs y polaridad (+), idénticas, de aproximadamente 9.2 Kb, empaquetadas en una nucleocápside de proteínas virales rodeadas por una envoltura o bicapa lipídica derivada de la membrana celular que lleva incluidas a las proteínas virales gp 120 y gp 41 (Greene, W.C. 1991).

A diferencia de lo que sucede con los virus descritos anteriormente, el genoma del VIH se replica en el citoplasma celular mediante la acción de enzimas virales (transcriptasa

reversa), dando origen a una molécula de DNA de dc que es transportada al núcleo celular en donde se integra en el genoma celular en forma de provirus. Es aquí, en donde se lleva a cabo la replicación viral, conjuntamente con la replicación celular (Ho, D.D. y cols. 1987).

El RNA genómico posee 3 genes denominados estructurales (gag, pol y env) que dan origen a las proteínas que constituyen al virus, y por lo menos a 6 genes denominados regulatorios (vpu, vif, vpr, tat, nef y rev) que dan origen a proteínas cuya función es regular la reproducción viral de diferentes maneras (Cullen, B.R. 1991a.; Cullen, B.R. 1991b.; Greene, W.C. 1991). Los productos de ambos tipos de genes participan de manera esencial en la producción de las partículas del VIH maduras.

El grado de morbilidad y mortalidad causado por la infección con el VIH ha tenido un impacto global en terrenos de la salud y de la economía (Epidemiology Bulletin. 1992).

El SIDA ya ha sido la causa de la muerte de un gran número de personas, y la enfermedad probablemente será la causa de la muerte de la mitad de los pacientes infectados (Epidemiology Bulletin. 1992).

Los ejemplos mencionados anteriormente de enfermedades causadas por virus de RNA, representan un grave problema de salud pública ya que son capaces de provocar infecciones que varían desde leves, hasta fulminantes y/o fatales, para las cuales no existe hasta hoy profilaxis inmunológica o cura alguna (Monath, T.P. 1990).

En este tipo de enfermedades, así como en aquellas provocadas por virus diferentes que causan cuadros clínicos similares, la prevención y la identificación etiológica (diagnóstico) del agente que las provoca es de suma importancia.

La prevención puede llevarse a cabo por vacunación, como ocurre con el virus de la poliomielitis; evitando el contacto sexual o sanguíneo con individuos infectados, como en el caso del VIH; o reduciendo las posibilidades de contacto con algunos animales, como en el caso del virus del dengue.

Una vez establecida la infección, es el diagnóstico el que representa un papel muy importante en el monitoreo de las poblaciones infectadas, con el fin de controlar y evitar el contagio y consecuente establecimiento de la enfermedad, sobre todo de aquellas para las cuales no existe curación.

Hasta la fecha, existe una gran variedad de metodología con diferentes estrategias diseñadas para la detección de diferentes virus, entre ellas podemos encontrar:

1.- **Ensayos inmunológicos.**- que permiten la detección inmunológica directa de antígenos virales, o de anticuerpos; tal es el caso de:

a.-**Inmunofluorescencia (IF).**- La técnica de inmunofluorescencia es un método simple y rápido, de fácil observación basado en la unión química de isotiocianato de fluoresceína a un anticuerpo específico con lo cual es posible medir una reacción antígeno-anticuerpo. Estos anticuerpos marcados poseen la habilidad de reaccionar específicamente con su respectivo

antígeno y cuando son observados en un microscopio de fluorescencia, el lugar de la reacción se detecta visualmente. Este es considerado un método de diagnóstico bueno en la detección de enfermedades infecciosas especialmente de origen viral por ser rápido y sencillo (Faure, y cols. 1977.; Emmos, R. y Riggs, J.L. 1977).

b.- Radioinmunoensayo (RIP).- Este ensayo es utilizado para la determinación cuantitativa de un antígeno o de un anticuerpo. La prueba consiste en la inmunoprecipitación de proteínas virales (antígeno) marcadas químicamente o radiactivamente mediante la reacción con un suero que presenta anticuerpos que lo reconocen y lo precipitan. Este precipitado es posteriormente separado en un gel y expuesto a autorradiografía.

c.-Técnica radioinmunoabsorbente (RIA), al igual que el RIP, se utiliza para la determinación cuantitativa de un antígeno. El ensayo consiste en el marcaje radiactivo de un antígeno viral, que es colocado en una columna que contiene un anticuerpo insoluble covalentemente unido a celulosa o Sephadex. La unión entre el antígeno marcado y el anticuerpo de la columna es competitivamente inhibido por el antígeno no marcado, presente en la solución estandar o en las muestras no conocidas que se desean examinar (Engevall, E. y Perlmann, P. 1971.; Cuello, A. 1983).

Tiempo después de la aparición de esta técnica, se implementó la unión del antígeno con una enzima en vez de un isótopo radiactivo, con lo que el ensayo resultó muy efectivo, ya que la

preparación de este nuevo conjugado (antígeno acoplado a una enzima) es más estable a través del tiempo y requiere de un equipo mas sencillo.

Este sistema fue llamado ensayo inmunoabsorbente unido a enzima o ELISA.

d.- Ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA).- El ELISA consiste en la adsorción pasiva de un antígeno o un anticuerpo a una superficie plástica a la que se le añade el suero que se desea probar y que probablemente posee antígeno o anticuerpos. El siguiente paso es la adición de un segundo anticuerpo que se encuentra marcado con una enzima y que es capaz de reconocer el complejo antígeno-anticuerpo preformado. Una vez ocurrido lo anterior, se añade a la mezcla de reacción el sustrato de la enzima acoplada al segundo anticuerpo, y la actividad de ésta es cuantificada a través de un ensayo espectrofotométrico que nos indica la cantidad de sustrato degradado, lo que indica a su vez la cantidad de inmunoglobulina marcada con la enzima, o cantidad de anticuerpo presente en la solución de prueba (Feldmann y cols. 1975.; Engeval, E. y Perlmann, P. 1971) (FIGURA C).

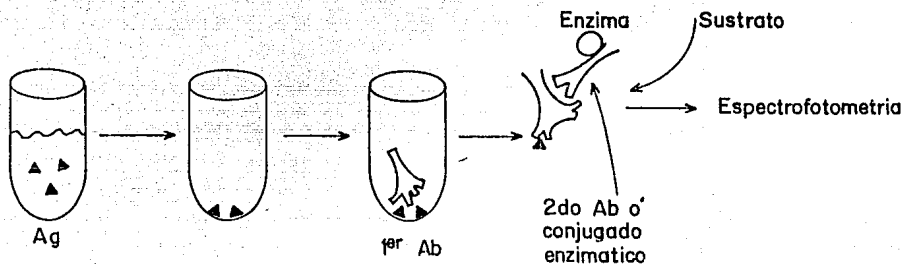


FIGURA C.- ENSAYO INMUNOABSORBENTE UNIDO A ENZIMA (ELISA).- El antígeno es precipitado y absorbido en una superficie a la que se le añade el suero que se desea probar (primer anticuerpo). A este complejo se le añade un segundo anticuerpo llamado antiglobulina que se encuentra unido a una enzima y que es capaz de reconocer al complejo preformado. Después de esto, se añade a la mezcla anterior el sustrato de la enzima acoplada al segundo anticuerpo y la actividad de esta se cuantifica por espectrofotometría.

e.- Ensayo de Western blotting o inmunotransferencia.- Este ensayo consiste en la separación electroforética en gel de componentes antigénicos y la subsecuente transferencia de éstos a un soporte sólido. Este es puesto posteriormente a reaccionar con sustancias reactivas específicas (que pueden ser los anticuerpos presentes en los sueros que se desean analizar), capaces de reaccionar con las diferentes secuencias de las proteínas antigénicas. Después de que se lleva a cabo la reacción, se añade un conjugado de un anticuerpo acoplado a una enzima y posteriormente el sustrato de dicha enzima, que revela el resultado en patrones de bandas correspondientes al antígeno. Este ensayo, confiere la ventaja de distinguir por tamaño a los diferentes antígenos virales, dando a conocer el peso molecular de cada uno de ellos (Sambrook, J. y cols. 1989).

2.- Crecimiento viral en cultivo de tejidos. .

El aislamiento de virus de cultivos celulares es uno de los métodos en los que es posible observar de manera directa una infección viral. El descubrimiento de varios virus (como el rinovirus, adenovirus, etc.) es atribuible al uso de esta técnica, al igual que el diagnóstico de enfermedades virales y el desarrollo de vacunas como la de la poliomielitis, rubeola y sarampión (Fenner, F. y col. 1974).

La detección de la proliferación viral en cultivo celular, puede hacerse a través de procedimientos bioquímicos que indican un incremento intracelular de moléculas virales y viriones, aunque también pueden usarse algunos procedimientos mas simples, como lo

son efecto citopático, hemadsorción y específicamente para retrovirus los ensayos de reverso transcriptasa, que consisten en medir la conversión de nucleótidos radiactivos libres a una forma ácida insoluble (DNA), a través de la acción de una polimerasa dependiente de RNA (RT) (Weiss, R. y col. 1982.; Rey, M.A. y cols. 1984). El ensayo de RT requiere el demostrar algunas de las propiedades ya conocidas de la enzima, de su producto y de la partícula viral, como lo son, que la RT se encuentre en la misma densidad en la que migra el virus de estudio en gradientes isopícnicos, el demostrar una actividad de DNA polimerasa endógena, probar que el producto es DNA y que se encuentra asociado a RNA viral en estudios tempranos, y por último que la actividad enzimática es inhibida con antisuero contra la enzima (Kacian, L. 1977).

La presencia de la RT en células y virus no es fácil de detectar, a menos que puedan obtenerse grandes cantidades de virus. Es por esto que esta metodología debe de ponerse en consideración ya que aunque es posible tener la tecnología para llevarla a cabo, los resultados finales no suelen ser siempre concluyentes con respecto a la presencia de la enzima.

3.- Hibridación con ácido nucléico. Este método se basa en la detección de secuencias virales específicas presentes en lisados de células infectadas, (ya sea "in vitro" o en muestras clínicas) por medio de secuencias complementarias de DNA viral obtenido a partir de clonas, siendo al igual que los ensayos de cultivo de tejido,

una metodología que detecta directamente la presencia del virus.

Esta técnica se encuentra limitada a algunos virus de DNA y RNA y a un pequeño número de laboratorios. A pesar de ello, se ha demostrado la posibilidad de detectar pequeñas cantidades de virus de hepatitis B, Epstein-barr, herpes simplex tipo 1, citomegalovirus, adenovirus, rotavirus y papilomavirus (McIntosh, K. 1990).

De los métodos mencionados anteriormente, los inmunológicos ponen de manifiesto a través de diferentes estrategias la presencia de anticuerpos inducidos por un virus determinado, lo que es indicativo de una exposición al virus. En algunos casos, como en el de la infección por VIH, la presencia de anticuerpos es indicativa de la presencia del virus, lo que a su vez se considera equivalente a la infección. En otros casos, como en el del virus del dengue o el de la poliomiелitis, la presencia de anticuerpos puede indicar tanto una infección aguda, como una infección de tiempo atrás, que no significa que el virus se encuentre en el organismo en ese momento (Luciw, P. y col. 1989).

Otra desventaja que presenta esta metodología es la baja sensibilidad para detectar la infección durante las etapas tempranas de la misma, en las cuales no necesariamente se ha presentado seroconversión, ya que ésta se lleva a cabo posteriormente (en el caso de una infección con VIH, entre la segunda y la octava semana postinfección).

Con el uso de este tipo de metodologías de diagnóstico, en algunos casos se obtienen resultados falso negativos, lo que sucede

frecuentemente en individuos en etapas tempranas de la infección, al emplear métodos de baja sensibilidad, debido a una pobre producción de anticuerpos en infecciones provocadas por un virus con baja antigenicidad, en pacientes inmunocomprometidos, o cuando la formación de complejos inmunes remueven a los anticuerpos (Evans, A. S. 1976).

De manera opuesta, se pueden obtener resultados falso positivos por cruce antigénico, debido a la presencia de otras infecciones virales o a que el paciente presente algún tipo de enfermedad autoinmune o proliferativa (Evans, A.S. 1976.; Abbas, A.K. y cols. 1991).

El método de aislamiento viral a través de un cultivo de tejido es una buena alternativa de diagnóstico ya que es uno de los pocos métodos que detectan la presencia de virus infectivos directamente, por lo que es comunmente utilizada para confirmar la presencia de un determinado virus en aquellos pacientes en donde la infección es sujeto de duda, (por ejemplo, en el caso de pacientes pediátricos con SIDA menores de 15 meses de edad en donde los anticuerpos maternos pueden confundir la serodiagnósis). Sin embargo, este tipo de metodología suele ser muy larga, (hasta 45 días) y requerir equipo sofisticado, además de que no siempre es exitosa y suele ser muy cara (entre 250 y 1000 dls. cada prueba) (Luciw, P. 1989).

En el laboratorio se planteó una metodología alternativa de detección viral que involucra la aplicación de técnicas de DNA recombinante. Esta consiste en la construcción de una sonda de RNA

o ribosonda, es decir, una secuencia de RNA sintetizada a partir de una molécula de DNA complementario recombinante, capaz de detectar por complementaridad secuencias virales específicas en cultivos infectados, sueros de pacientes e incluso en heces y aguas residuales (Cova, L. y cols. 1988).

A través de esta metodología intentamos resolver algunos de los problemas que se presentan con el uso de las metodologías anteriormente mencionadas, como lo son la detección precisa de partículas virales determinadas, que es de gran importancia sobre todo en etapas tempranas de la infección, la rapidéz en la obtención de los resultados y la sensibilidad de la detección.

Las ribosondas además de presentar ventajas sobre las metodologías convencionales de diagnóstico, presentan también ventajas sobre las metodologías de hibridación molecular (especialmente la que se refiere a las sondas de DNA), ya que son capaces de detectar títulos de 1.5 ordenes de magnitud menores de lo que una sonda de DNA es capaz de detectar (Cova, L. y cols. 1988). Estas pueden sintetizarse en gran cantidad (pueden obtenerse hasta 10 ug de RNA a partir de 1ug de DNA), y si la síntesis se lleva a cabo en presencia de isótopos radiactivos, se obtiene una alta actividad específica, desde 2×10^6 cpm hasta 2×10^8 cpm por ug de RNA (Cova, L. y cols. 1988). La estabilidad entre los híbridos de moléculas de RNA es mucho mayor que la que se presenta entre moléculas de DNA o hibridaciones entre moléculas de RNA con moléculas de DNA, lo que incrementa la eficiencia de la metodología hasta diez veces (Cova, L. y cols. 1988.; Melton, D.A. 1984).

Las ventajas anteriormente descritas pueden permitir un control mas eficaz en el monitoreo de las poblaciones infectadas ya que con el uso de esta metodología se puede detectar la presencia de infecciones incipientes antes de lo que otras pueden hacerlo, lo que puede ayudar en el control del contagio y por lo tanto evitar el establecimiento de la infección y / o enfermedad en nuevas poblaciones.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

DISEÑO Y CONSTRUCCION DE RIBOSONDAS PARA LA DETECCION DE SECUENCIAS VIRALES COMO UN METODO ALTERNATIVO DE DIAGNOSTICO TEMPRANO.

OBJETIVOS PARTICULARES

- CLONACION DE SECUENCIAS DEL VIH 1, DEL POLIOVIRUS Y DEL VIRUS DEL DENGUE.

-SINTESIS DE RIBOSONDAS DEL VIH 1, POLIOVIRUS Y VIRUS DEL DENGUE.

-DETECCION DE SECUENCIAS GENOMICAS DEL VIH 1, POLIOVIRUS Y VIRUS DEL DENGUE EN CULTIVOS DE CELULAS INFECTADAS.

METODOLOGIA

I.- CONSTRUCCION DE RIBOSONDAS

1.- Ensayos de restricción de DNA plasmídico.

La digestión de secuencias consiste en someter al DNA a cortes específicos con las enzimas de restricción de elección y su correspondiente amortiguador e incubar a la temperatura y al tiempo requeridos por la enzima. En general se siguen las especificaciones y se utilizan amortiguadores recomendados por el proveedor.

2.-Preparación de geles de agarosa.

Se disuelve la agarosa en una solución de Tris boratos (TBE) (89 mM de Tris base pH8.0, 89 mM de ácido bórico y 2.5 mM de EDTA) a temperatura de ebullición. La concentración de agarosa para la electroforesis de fragmentos pequeños (alrededor de 500 pb) debe ser entre 1.1 a 1.3% y para fragmentos mayores de 1200 pb debe ser entre 0.7 y 1.0 %.

La solución de agarosa se vierte dentro de un molde de acrílico de aproximadamente 8 x 5 cm con su correspondiente peine y se deja solidificar a temperatura ambiente (T A)

3.-Electroforesis y tinción de secuencias de DNA en geles de agarosa.

El gel se sumerge en una cámara de acrílico con amortiguador TBE a una concentración final de 0.5X, se retira el peine de la agarosa y se colocan las muestras con su respectivo amortiguador de muestra en cada uno de los pozos. El gel se somete a electroforesis a 100 volts durante tiempos variables dependiendo de la

concentración del gel y del tamaño de los fragmentos de DNA que se encuentren migrando. Posteriormente, se añade a la solución amortiguadora de corrida 5 μ l de una solución de bromuro de etidio (Br Et) a una concentración de 10 mg/ml. Para conocer los pesos moleculares de los fragmentos generados por restricción y observarlos mediante esta metodología, es necesario migrar en el gel de manera paralela a las muestras, marcadores de peso molecular conocidos para utilizarlos como referencia. Las bandas de DNA se visualizan por exposición del gel a la luz ultravioleta sobre un transiluminador de onda larga.

4.- Obtención de fragmentos de DNA mediante el método de agarosa de bajo punto de fusión.

Una vez detectados los fragmentos deseados en el transiluminador de onda larga, pueden separarse cortando la agarosa en donde se encuentra dicho(s) fragmento (s); esta se coloca en la cámara formadora de geles y se añade agarosa de bajo punto de fusión (LMA) hasta cubrir completamente el fragmento de agarosa. (La LMA se prepara de manera similar a la agarosa y debe colocarse en el molde a una temperatura lo suficientemente baja para no disolver la fracción de agarosa que contiene al fragmento). Una vez solidificado el gel, se somete a electroforésis a 70 volts de 15 a 20 min, tiempo suficiente para que el fragmento de DNA salga de la agarosa y penetre a la LMA.

El fragmento se corta procurando tomar la menor cantidad de LMA posible, se coloca dentro de un tubo eppendorf y se funde a 70° C. Se añaden tres volúmenes de agua o de solución TE (1mM de Tris-

HCl, 0.1 mM de EDTA) y se incuba a la misma temperatura hasta que la LMA este fundida completamente. Posteriormente se realiza una extracción fenólica de la muestra.

5.- Extracción fenólica.

La extracción fenólica consiste en la adición de un volúmen de fenol saturado con Tris-base a la mezcla en donde tenemos al DNA y una centrifugación posterior en una microfuga a 12 Krpm, 15 min a T A. La fase acuosa, es decir la superior, se transfiere a un tubo limpio, se le añade un volúmen igual de fenol-cloroformo (1:1) y se centrifuga a 12 Krpm, 15 min. a T A. La fase acuosa se transfiere a un tubo limpio y se le añade un volúmen igual de cloroformo y se centrifuga a 12 Krpm, 15 min. a T A. Se toma nuevamente la fase acuosa y el DNA se precipita con 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se deja 30 minutos a -70° y se centrifuga a 12 Krpm, 30 min a 4° C. Se retira el sobrenadante y la pastilla se resuspende en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

6.-Clonación.

Se hace una purificación tanto del segmento de DNA que quiere clonarse (fragmento) como el vehículo de expresión (vector) mediante la técnica de extracción fenólica. El fragmento se resuspende en agua DEPC y al vector se le somete a una reacción de desfosforilación con 1/10 de volúmen final de reacción de enzima fosfatasa alcalina bacteriana (BAP) y una concentración final 1X de solución amortiguadora de la BAP (comercial) 1 hr. a 37° C. El vector desfosforilado se precipita con acetato de sodio y se

resuspende en agua DEPC.

La reacción de ligación se lleva a cabo con concentraciones constantes del vector y concentraciones crecientes del fragmento en una proporción de 1:0, 1:1, 1:2 y 1:3. A esta mezcla se le adiciona 1/10 del volúmen final de la enzima DNA ligasa T4 y la solución amortiguadora correspondiente (comercial) a una concentración final de 1X. La reacción de ligación que se lleva a cabo con fragmentos de DNA que presentan extremos cohesivos o asimétricos se incuba a 16° C toda la noche, mientras que en presencia de fragmentos no cohesivos o simétricos se incuba a T A toda la noche.

7.- Transformación bacteriana (Competencia y transformación celular).

a).- El proceso de competencia consiste en sembrar las bacterias en cajas petri con medio de Ua (ver apéndice) e incubarlas toda la noche a 37°C. Se toma una de las colonias y se siembra en 5 ml de medio Ub (ver apéndice) en un matrás de 125 ml, y se incuba aproximadamente 4 hrs a 37°C hasta que alcance una D.O. de 0.3 a 550 nm. Este cultivo se transfiere a un matrás de 500 ml que contiene 100 ml de medio Ub precalentado a 37°C , y se incuba a esta misma temperatura hasta que alcance una D.O. de 0.48 + 0.02. lo que ocurre en aproximadamente 2 hrs. Se enfría el matrás en hielo 5 min y se centrifuga a 6 Krpm, 5 min. a 4° C en una centrífuga Sorvall con un rotor SS34. La pastilla obtenida se resuspende con mucho cuidado y sin hacer burbujas en 40 ml de medio TFb 1 frio (ver apéndice). Esta suspensión se deja en hielo 5 min y se centrifuga a 6 Krpm, 5 min. a 4° C. La pastilla se resuspende

en 4 ml de medio Tfb 2 frío (ver apéndice) y se deja en hielo 15 min. Las bacterias se alicuotan en tubos eppendorf de 0.5 ml que estuvieron previamente en hielo seco y se almacenan a -70° C.

b).- El proceso de transformación celular consiste en descongelar lentamente a las bacterias competentes en hielo, una vez descongeladas se les añade 1/10 del volúmen de una solución de β -mercaptoetanol (9:491 con agua) y se dejan en hielo 10 min. Se toman muestras de 50 μ l y se colocan en tubos eppendorf a los que se les añade de 1 a 2 μ l de las muestras de DNA para transformar. Los tubos se enfrían en hielo 30 min y posteriormente se incuban a 42° C, 90 seg y se regresan al hielo 2 min. A cada tubo se le añaden 200 μ l de medio Ub en campo estéril y se incuban en agitación 1 hr a 37° C. Se vacía el contenido de los tubos en cajas de petri con medio MacB amp (ver apéndice) y se siembran en campo estéril. Se secan a T A, se invierten y se dejan incubando toda la noche a 37° C.

8.- Propagación del plásmido.

1).- **Minipreparación de DNA** (Método de minipreparación en un solo tubo de Del Sal y cols).

Cada colonia de bacterias transformadas se siembra independientemente en un tubo con 5 ml de medio Luria (ML) estéril (ver apéndice), se deja crecer en agitación toda la noche a 37° C. Se toma 1.5 ml de este cultivo y se centrifuga en una microfuga a 12 Krpm, 1 min a T A. Se retira el sobrenadante y se resuspende cada paquete en 200 μ l de solución amortiguadora de STET (ver apéndice), 4 μ l de una solución de lisozima (50 mg/ml) y se incuba

5 min. a T A. Se hierven los tubos 45 seg y se centrifugan a 12 K, 5 min. a T A. La pastilla obtenida se retira con un palillo estéril y se desecha. Al sobrenadante se le agregan 8 μ l de una solución de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) (5% V/V). Se deja unos minutos a T A. y se centrifuga a 12 Krpm, 5 min a T A. La pastilla se resuspende en 300 μ l de cloruro de sodio 1.2 M por agitación y se reprecipita agregando 750 μ l de etanol absoluto frío. Se centrifuga a 12 Krpm 10 min a T A y la pastilla obtenida se lava con etanol al 70%. Se resuspende en agua tratada con DEPC.

Una vez resuspendida la pastilla de DNA plasmídico, se hace un análisis enzimático.

2.- Maxipreparación con el método de Cloruro de Cesio (ClCs).

Se crecen bacterias en 5 ml de Medio Luria con el antibiótico de selección. Se traspasa la muestra en condiciones de esterilidad a un matrás de 1 lt que contiene 500 ml del mismo medio y cuando el cultivo tiene una D.O. de 0.8 a 600 nm (aprox. 6 hr. después del inóculo) se le añade cloranfenicol a una concentración de 125 mg/ml.

El cultivo se incuba con agitación durante toda la noche a 37°C. Se centrifuga en el rotor SS34 de una centrifuga Sorvall, a 10 Krpm, 20 min a 4°C. El sobrenadante se desecha y la pastilla se resuspende en un volúmen final de 3.1 ml de solución TS (25% de sacarosa ultrapura, 50 mM de Tris-HCl pH 7.5). La suspensión se transfiere a tubos de 15 ml, se agregan 0.3 ml de solución de lisozima (10 mg/ml de lisozima, 25 mM de Tris-HCl pH 7.5) y se

incuba 5 min en hielo. Se le agregan 1.15 ml de una solución de EDTA 200mM y se incuba 5 min. en hielo, se le añaden 4.5 ml de solución de Triton (1% de Triton X 100, 62.5mM de EDTA, 50 mM de Tris-HCl pH 7.5) mezclando por inversión. Se incuba 10 min. en hielo. La preparación se decanta cuidadosamente a un tubo de policarbonato de 10 ml y se centrifuga en el rotor 50 Ti a 30 Krpm, 30 min a 4° C. El sobrenadante se decanta en un tubo de 15 ml, se mide el volúmen, se agregan 0.95 g/ml de CsCl sólido y se mezcla por inversión. Al volúmen final, se le agregan 200 µg/ml de BrEt. La solución se transfiere a tubos de polialómero para rotor 50 Ti que se equilibran con aceite mineral por la parte superior. Las muestras se centrifugan a 45 Krpm, 36 hrs 15° C. Se extrae la banda inferior del tubo, que es visible cuando la irradiamos con luz UV de onda corta, (que corresponde al DNA del plásmido) mediante una punción con una jeringa de 3 ml, se retira la aguja y la muestra se coloca en un tubo de plástico de 15 ml. Se lava con un volúmen igual de isopropanol saturado con cloruro de sodio y se mezcla por inversión. Se remueve la fase superior y se repite el paso hasta que el color rosado de el BrEt desaparezca de la fase acuosa. La fase acuosa se dializa contra un litro de solución de TE toda la noche a 4°C con dos cambios. Al dializado final se le determina la absorbancia a 260 nm para conocer la concentración final de DNA plasmídico.

II. SINTESIS DE RIBOSONDAS.

1.- Transcripción "in vitro" en presencia de isótopos radiactivos.

El DNA plasmídico se digiere con la enzima deseada y se somete a una extracción fenólica; el DNA cortado se precipita con 1/10 de volúmen de acetato de sodio y 2 volúmenes de etanol absoluto frio. Se centrifuga en una micrófuga a 12 Krpm, 30 min a 4°C y la pastilla se resuspende en agua con DEPC. La reacción de transcripción "in vitro" en presencia de ^{32}P (transcrito caliente) se lleva a cabo en un tubo eppendorf de 1.5 ml, al cual se le añaden 8 μl de agua tratada con DEPC, 6 μl de solución amortiguadora de la transcripción (comercial 5X), 3 μl de DTT (100 mM), 1 μl de RNasín (Promega), 6 μl de una solución de nucleótidos (2.5 mM de ATP, CTP GTP y 0.25 mM de UTP), 2 μl de la mezcla de UTP α ^{32}P (Ammersham) (con una actividad específica de 600 mCi/mmol), 3 μl de la muestra de DNA (1 μg), y 1 μl de la polimerasa T7 o Sp6 comercial. Esta mezcla se incuba 1 hr a 37 ° C en el caso de usar la polimerasa T7 y a 40°C en el caso de usar la polimerasa SP6. Se añaden de 1 a 2 μl de DNasa RQ1 y se incuba 15 min. a 37°C. Esta solución se lleva a un volúmen final de 100 μl . Se hace una extracción fenólica, después de la cual se pasa a través de una columna de Sephadex G 50 y se centrifuga a 2 Krpm, 3 min a 4°C.

De la solución que se obtiene se toma una alícuota de 1 μl y se coloca en un papel Wattman 3MM, se deja secar y se coloca en un tubo vial con 5 ml de una solución de Tritón-tolueno (ver apéndice). Las emisiones radiactivas se miden en un contador de

centelleo en el canal de ³²p.

III.- EXTRACCION DEL RNA DE CELULAS INFECTADAS Y NO INFECTADAS.

Para un manejo correcto de las metodologías de RNA es estrictamente necesario que se trabaje siempre con guantes, material horneado y el de plástico que sea nuevo y de preferencia esterilizado. El agua con la que se preparan las soluciones debe estar tratada con DEPC, y los reactivos deben ser pesados en recipientes horneados y vertidos con espátulas horneadas o de preferencia sin introducir ningún utensilio. Para las mediciones de pH, deben tomarse alicuotas para evitar una posible contaminación.

1.- Extracción de RNA citoplásmico.

Para la extracción del RNA citoplásmico, se cultivan las células deseadas en cajas o en suspensión y se lavan 2 veces con PBS (ver apéndice) y posteriormente se centrifugan en una micrófuga a 12 Krpm, 1 min a T A. En el caso de las células cultivadas en caja, se despegan previamente con 750 μ l de una solución amortiguadora de despegado (ver apéndice) para cada caja P100 y 325 μ l para cada caja P60. La pastilla se resuspende en 200 μ l de una solución de RSB-NP40 (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 1% NP40) y subiendo y bajando la mezcla 4 a 5 veces con una pipeta Gilson de 1 ml. Se verifica en el microscopio con una alicuota que la mayoría de las células estén rotas y los núcleos íntegros. Se centrifuga a 12 Krpm, 5 min a 4° C. A este sobrenadante se le añade SDS a una concentración final de 5% y 1 volumen de fenol. Se centrifuga a 12

Krpm, 5 min a 4 °C. La fase acuosa se transfiere a otro tubo limpio y se le añade un volúmen de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y se centrifuga a 12 Krpm, 5 min a 4 °C. La fase acuosa se transfiere a un tubo limpio y se vuelven a repetir los dos pasos anteriores. A continuación la fase acuosa se transfiere a un tubo limpio, se le añade 1/10 del volúmen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se deja a -70°C toda la noche. Puede almacenarse o procesarse para su utilización, lo que consiste en centrifugar las muestras en una microfuga 12 Krpm, 30 min a 4°C. La pastilla obtenida se deja secar completamente y se resuspende en agua tratada con DEPC.

2.- Extracción de RNA mediante el método de Isotiocianato de guanidina (ITCG).

Las células crecidas tanto en caja como en suspensión se lavan dos veces con solución PBS. Al paquete celular, se le agregan 3.5 ml de una solución de ITCG (ver apéndice). Esta solución se hace pasar 4 veces hacia arriba y abajo con una jeringa de 5 ml con aguja 20 G, y se transfiere a un tubo limpio. Por otro lado, se colocan 1.5 ml de una solución de ClCs (5.7 M de ClCs, 100 mM de EDTA pH 8.0) en un tubo de polialómero previamente hervido con EDTA y esterilizado en autoclave. Se transfiere la solución del lisado celular al tubo anterior muy lentamente formandose una interfase visible. Se centrifuga en una ultracentrífuga con un rotor SW 50.1 a 35 Krpm de 12 a 20 hrs a 18°C con aceleración y freno paulatino. Se retira el sobrenadante poco a poco con una pipeta gilson de 1 ml, dejando en el tubo aproximadamente 100 µl de

la solución, se invierte el tubo lentamente y la pastilla se deja aerear 10 min. Se resuspende en 360 μ l de solución TES (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 5mM de EDTA, 1% SDS) utilizando una pipeta Gilson de 1 ml y se transfiere a un tubo eppendorf de 1.5 ml limpio. Durante este paso, se debe poner mucha atención en que la pastilla quede completamente resuspendida. Se agragan 40 μ l de una solución de acetato de sodio 3 M y 1 ml de etanol absoluto frío y se precipita 30 min. a -70°C . Se centrifuga en una micrófuga a 12 Krpm, 30 min a 4°C . La pastilla puede resuspenderse en agua tratada con DEPC para un uso inmediato o bien puede almacenarse precipitada en etanol absoluto para su uso posterior. Se cuantifica la cantidad de RNA obtenida por espectrofotometría y se revisa la integridad de este en un minigel de agarosa teñido con BrEt.

3.- Extracción de RNA poli A+.

En la parte interior de una pipeta pasteur larga horneada se coloca un tapón de fibra de vidrio estéril con la ayuda de otra pipeta horneada. En la parte exterior de la punta de la pipeta, se coloca una manguera de plástico transparente, nueva y estéril (cateter de alimentación) de 2.63 mm de diámetro exterior y se flamea con un mechero para fundirla con el vidrio de la pipeta. (Puede reforzarse con papel parafilm). Una vez revisado que esté bien sellada, se sujeta en un soporte universal y se coloca en el extremo final de la manguera, una pinza para regular el flujo de salida de las soluciones. Se introduce en la pipeta un volumen aproximado de 1 ml de solución amortiguadora de carga estéril con 0.1 g de oligo dt celulosa (ODTC) (ver apéndice) para formar una

columna de aproximadamente 1.5 cm de alto, se lava con 3 a 5 volúmenes de agua estéril tratada con DEPC, de 3 a 5 volúmenes de una solución de 100 mM de hidróxido de sodio con 5mM de EDTA. Se enjuaga con agua tratada con DEPC hasta que el pH de la solución eluyente sea menor de 8.0. La columna se lava con 5 volúmenes de solución amortiguadora de carga estéril 1X con SDS (ver apéndice).

La muestra se prepara añadiendo al RNA un volumen de solución amortiguadora de carga con SDS 2X, se calienta 30 min. a 55°C y se enfría en hielo por unos minutos. La muestra se vierte en la columna y se colecta con un flujo muy lento en un tubo eppendorf nuevo. Este paso se repite tres veces más y en la última se deja la muestra sin eluir durante un tiempo mínimo de media hora. La columna se lava con 8 ml de solución amortiguadora con SDS 1X muy lentamente y con 2 ml de solución amortiguadora de carga sin SDS 1X que se colectan en un tubo Corex de 15 ml. En esta fracción se obtiene al RNA poli A -. El RNA poli A+ se eluye muy lentamente con 5 ml de solución amortiguadora de elución (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA) en otro tubo Corex de 15 ml horneado. Una vez obtenidas las muestras se precipitan con 1/10 de volumen de acetato de sodio y dos volúmenes de etanol absoluto frío toda la noche. Para obtener la pastilla, se centrifuga en un rotor SS34 de una centrifuga Sorvall, a 10 Krpm, 30 min a 4 °C. Se retira el sobrenadante y la pastilla se deja secar unos minutos a T A. para posteriormente resuspenderla en agua tratada con DEPC.

IV.- FIJACION DEL RNA A PAPEL DE NITROCELULOSA.

1.- Técnica de transferencia en franja.

Se corta el papel de nitrocelulosa del tamaño del aparato de transferencia y se sumerge completamente en agua 10 min. Se transfiere a una solución de SSC (1.5 M cloruro de sodio, 0.15 M citrato de sodio anhidro) 10X, 20 min y se coloca en el aparato de transferencia. Cada pozo se lava con 400 μ l de solución SSC 10X la cual se extrae con vacío. Se colocan entonces cada una de las muestras que previamente han sido tratadas de la siguiente manera: en tubos eppendorf nuevos esteriles de 0.5 ml se colocan 300 μ l de una solución de SSC-F (10X SSC y 46% de formaldehído comercial), los μ l que se requieran de muestra de RNA y el resto de agua tratada con DEPC para obtener un volúmen final de 400 μ l. Todas las muestras se calientan 15 min a 65°C justo antes de colocarse en el aparato de transferencia y se filtran en papel de nitrocelulosa con vacío. Nuevamente se lava cada pozo con solución SSC 10X. Se retira el filtro y se enjuaga en solución SSC 10X. Se hornea 2 hrs a 80 °C con vacío. El papel puede almacenarse entre dos hojas de papel Whattman dentro de una bolsa de plástico a 4°C.

2.- Técnica de transferencia tipo Northern.

a.-Preparación del gel de agarosa-formaldehído al 1.2%.

Para preparar el gel, se hierven 2.4 gr de agarosa en 174 ml de agua tratada con DEPC en un matrás estéril y horneado. Una vez disuelta la agarosa, se enfria a 60 °C; cuando el matrás ha alcanzado esta temperatura se le agregan 20 ml de solución amortiguadora MOPS 10X (ver apéndice) y 6.0 ml de formaldehído

comercial, se mezcla bien y se vuelve a colocar de 5 a 10 min. a 60°C La agarosa se vierte en la cámara de electroforésis y se deja solidificar para que se forme el gel. El peine no se retira sino justo unos minutos antes de poner las muestras en los pozos.

b.- Preparación de las muestras de RNA.

En tubos eppendorf de 1.5 ml se coloca en un volúmen final de 50 μ l, 1X de solución MOPS, 17.5% de formaldehído comercial con pH mayor de 5.0, 50% de, formamida ultrapura desionizada y la muestra de RNA en agua DEPC. Los tubos se agitan con un vortex y se centrifugan en una microfuga a 12 Krpm unos segundos a T A para que toda la muestra resbale hasta el fondo del tubo. Estos se incuban 15 min. a 65°C y se colocan en hielo. A cada tubo se le añaden 10 μ l de solución amortiguadora de muestra de formaldehído (FLB: 1mM de EDTA pH 8.0, 0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de xilencianol, 5% de glicerol), se mezcla con un vortex y se centrifuga brevemente.

c.- Electroforésis del gel de agarosa-formaldehído.

El gel se coloca en la cámara de electroforésis y se cubre con solución amortiguadora de corrida MOPS 1X. Se retira el peine y enseguida se van colocando las muestras en cada uno de los pozos del gel. El gel se somete a un voltaje de 100 V, por un tiempo máximo de 3 horas durante las cuales el colorante de las muestras debe sobrepasar la mitad del gel.

d.- Transferencia del gel a papel de nitrocelulosa.

Si se corrieron las muestras por duplicado, en este momento se corta el gel mediante un corte con navaja para que uno

de los duplicados sea teñido. La parte del gel que se va a transferir a papel de nitrocelulosa se coloca en un recipiente con agua destilada en agitación que se recambia de tres a cuatro veces cada 5 min aproximadamente hasta que el formaldehído se haya salido por completo del gel; después, este se sumerge en solución SSC 10X, 45 min en agitación. Mientras tanto, se corta la nitrocelulosa de un tamaño un poco mas pequeño que el gel (aproximadamente 3 mm menos en ambas dimensiones) y se coloca 1 min en agua y 10 min en SSC 20X usando siempre guantes. Se cortan de 3 a 5 hojas de papel Whattman 3MM de un tamaño aproximado de 6 mm menor que el gel.

El aparato de transferencia consta de una parte inferior o recipiente en donde se vierten de 1 a 2 l de solución SSC 20X; y una parte superior o puente sobre la cual se coloca una tira de papel Whattman 3MM previamente humedecida en solución SSC 20X de manera que los extremos hagan contacto con la solución del recipiente. Se retiran las burbujas formadas entre el papel y el puente y se coloca el gel sobre el papel con los pozos hacia este. Se retiran las burbujas y enseguida se coloca el papel de nitrocelulosa, uno de los papeles Wattman 3MM humedecido en solución SSC 20X y los otros papeles se colocan secos; sobre estos últimos se colocan 3 cm de altura de papel absorbente del tamaño del gel y sobre todo lo anterior se coloca un peso aproximado de 1 Kg. La transferencia se deja toda la noche a T A. Transcurrido este tiempo, se retiran todos los papeles, se toma la nitrocelulosa, se coloca entre dos papeles wattman y se hornea 2 hr a 80°C en un horno de vacío.

La parte del gel cortada que va a teñirse se deja en agua toda la noche a 4°C. Se retira del agua y se pone en una solución de 500 ml de agua con 25 μ l de BrEt 10 mg/ml. Se verifica en el transiluminador hasta que la tinción sea correcta y se fotografía. A veces es necesario desteñir en agua para observar mejor las bandas.

Cuando no se tiene suficiente muestra para hacer duplicados, en el momento de colocar las muestras en el gel, se les añade 1 μ l de una solución de BrEt 10 mg/ml. El BrEt que migre en el gel en sentido opuesto a las muestras, se retira cortando la agarosa de la parte superior de los pozos con una navaja. Una vez terminada la electroforésis, se fotografía el gel y se continúa la técnica como se indicó anteriormente.

V.- DETECCIÓN DE RNA VIRAL POR MEDIO DE RIBOSONDAS.

1.- Prehibridación e Hibridación de los papeles de nitrocelulosa.

En un tubo cónico de 50 ml, en un volúmen final de 2 ml, se pone: 50% de formamida desionizada, 5% de SSCPE, 150 mM de cloruro de sodio, 15 mM de citrato de sodio, 13 mM de fosfato de potasio, 1 mM EDTA a pH 7.2 ajustado con hidróxido de sodio), 5X de solución Denhardt's (1% de Ficoll, 1% de albúmina sérica bovina, 1% de polivinilpirrolidina), 0.1% de SDS, 250 mg/ml de DNA de esperma de salmón previamente calentado a ebullición 10 min y enfriado en hielo unos minutos. El papel de la transferencia tipo franja se humedece con SSC 6X y se introduce en el tubo que contiene la solución de prehibridación, procurando que se pegue a la pared de

este, retirando las posibles burbujas entre ambas superficies. Se cierra el tubo y se coloca en un horno de hibridación con rotación de 2 a 16 horas a 60° C. Si la hibridación es con papeles más grandes, como los de la transferencia tipo Northern, se recomienda que la prehibridación se haga en probeta con un volúmen de 7 ml.

Para la hibridación, solamente se agrega a la mezcla de prehibridación la ribosonda previamente calentada a ebullición 10 min y enfriada en hielo unos minutos y se deja en el horno con movimiento rotatorio toda la noche a 60°C.

2.- Lavado, exposición y revelado.

Una vez hibridados los papeles, se retiran del tubo y se colocan en un recipiente con una solución de SSC 0.2X 1 h a 60 °C con 3 cambios de solución cada 20 min.

El papel se coloca en una bolsa de plástico y se sella para que conserve la humedad. Se expone en un cassette con pantallas amplificadoras a -70°C. La placa puede revelarse desde las 3 horas de exposición.

VI.- CULTIVO DE LINEAS CELULARES

1.- Cultivo de células HeLa.

Células HeLa (derivadas de un carcinoma de cervix humano) fueron crecidas en cajas petri (p100) con 10 ml de medio Dulbecco (medio mínimo esencial modificado por Dulbecco), suplementado con 10% de suero de caballo y 1X de antibiótico. Las células se siembran en campo estéril (campana de flujo laminar), se incuban a 37° C con flujo de CO₂ el tiempo suficiente para obtener la confluencia.

2.- Cultivo de células CV-1P.

Células CV-1P (derivadas de riñón de mono) fueron cultivadas en medio Dulbecco suplementado con 10% de suero de ternera (neonato) y penicilina-estreptomina (PE) 1X, en cajas p100. Las células se siembran bajo las mismas condiciones que las células HeLa.

3.- Cultivo de células Molt.

Células Molt (derivadas de una línea linfocítica) fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con suero fetal bovino al 10% y 1X de antibióticos. Las células se siembran en campo estéril en frascos F 75 y se incuban a 37°C con flujo de CO² el tiempo suficiente para que lleguen a fase log (Gartner, S. y col. 1990).

VII.- INFECCION VIRAL.

1.- Infección con poliovirus.

Se cultivan de una a dos cajas P100 con células HeLa y cuando éstas están confluentes se les retira el medio y se lavan con medio Dulbecco sin suero. A cada caja se le agregan 50 µl del stock de virus del laboratorio (20 unidades formadoras de placa (UFP)/célula) y se dejan adsorber a T.A. 45 min. moviendo las cajas cada 15 min. Se le agrega a cada caja 5 ml de medio Dulbecco 1X con 5% de suero de caballo y se incuban las células 5 hrs a 37°C. Se les retira el medio y se añaden 375 µl de solución amortiguadora de despegado (ver apéndice) y se incuban 5 min a T A Estas se recogen y la muestra se coloca en un tubo eppendorf estéril. Se centrifugan a 12 K, 1 min a 4 °C para empaquetarlas y se les retira el

sobrenadante. La pastilla celular se congela y almacena a -20°C hasta su procesamiento.

2.- Infección con el virus del dengue.

Se cultivan de una a dos cajas P100 con células CV-1P y cuando están confluentes se les retira el medio y se lavan con MEM sin suero. A cada caja se le agregan $200\mu\text{l}$ del stock del laboratorio (0.1 UFP/célula) y se dejan a T A 1.5 hrs a T.A. moviendo las cajas cada 30 min. Se añaden 5 ml de medio MEM con suero al 2% y se incuban a 37°C , 3 días. Pasado este tiempo, se cosechan las células de la misma manera que en el inciso anterior.

3.- Infección con el virus de inmunodeficiencia humana.

Se cultivan las células molt en frascos, y se dejan crecer hasta alcanzar la fase de crecimiento logarítmica, y es entonces cuando las células son infectadas según la metodología de Gartner S. y col. 1990. Durante los primeros días postinfección, es decir, durante la fase de infección aguda, se debe observar la formación de sincicios, y a medida que la infección se estabiliza, deben hacerse ensayos de inmunofluorescencia (Emmos y col. 1977), y de reversotranscriptasa (Rey, M.A. y col. 1984) con la finalidad de corroborar que la infección se ha estabilizado, es decir, que ha habido integración del genoma viral en el celular. Una vez sucedido lo anterior, las células se cultivan como se ha mencionado con anterioridad, manteniéndose así los cultivos con virus integrado.

RESULTADOS

Los virus constituyen el grupo de patógenos más importante para el ser humano, ya que representan el 60% del total de las infecciones que en él se producen. Por esta razón, la virología se ha dedicado actualmente no solo al aislamiento y caracterización, sino también al entendimiento de las bases y mecanismos moleculares implicados en la patogenia de estos agentes.

Uno de los aspectos que ha sido importante en la resolución de problemas relacionados con el estudio de las enfermedades de etiología viral, lo constituye el diagnóstico, sobre todo en caso de aquellas infecciones graves o mortales, como es el caso del SIDA y la enfermedad de fiebre por dengue, que representan un problema importante tanto desde el punto de vista de salud pública como epidemiológico.

Los métodos de diagnóstico comunmente utilizados, han resuelto satisfactoriamente gran parte de las necesidades para las cuales fueron creados, sin embargo, es una realidad que ellos presentan algunas desventajas, como lo son la aparición de reacciones cruzadas y la dificultad de detectar la infección en etapas tempranas de la misma. Para resolver estos problemas, se planteó en el laboratorio la construcción de ribosondas, (es decir, secuencias de RNA capaces de detectar por complementaridad regiones del genoma viral), como un método alternativo de diagnóstico. Las ribosondas que se construyeron, nos permiten detectar secuencias genómicas del VIH, poliovirus y virus del dengue.

**DISEÑO Y CONSTRUCCION DE LOS PLASMIDOS CON LAS SECUENCIAS
DEL VIH 1.**

Con el fin de construir un vehiculo de expresi3n que nos permitiera generar una ribosonda capaz de detectar secuencias gen3micas del VIH 1, se utiliz3 al pl3smido pBH10 cuya secuencia puede observarse en la figura 1-A, donado al laboratorio por el Dr. Haseltine, Harvard Medical School, Massachusetts, USA. Este pl3smido se construy3 clonando en el pl3smido pSP64, la secuencia del DNA complementario del VIH 1 completa (HTLV IIIb), a excepci3n de una regi3n de 182 pb que corresponde al sitio de uni3n con el "primer" tRNA y a parte de la secuencia lider localizada en la zona R y U5 del LTR 3' (Retner, L. y cols 1985). El pl3smido pBH10, contiene adem3s el gene de resistencia a ampicilina (gene de β -lactamasa), un 3rigen de replicaci3n, una regi3n denominada polilinker con sitios 3nicos de corte para diferentes enzimas de restricci3n y el promotor del bacteriofago Sp6 de Salmonella typhimurium, mediante el cual es posible la transcripci3n de secuencias que se encuentren hacia abajo del promotor, es decir, nos permite s3ntetizar mol3culas de RNA o ribosondas (Melton, D.A. y cols. 1984).

Para poder construir la ribosonda, se llevaron a cabo una serie de procedimientos que consistieron en primer lugar, en comprobar la identidad del pl3smido determinando el patr3n de corte

con enzimas de restricción. En la figura 1-A, se observa el mapa de restricción del plásmido pBH10, y en la 1-B, la fotografía de un gel de agarosa en el que se observan los fragmentos generados con cada una de las enzimas elegidas, los cuales corresponden en tamaño a los fragmentos esperados, lo que nos asegura que estábamos trabajando con el plásmido adecuado.

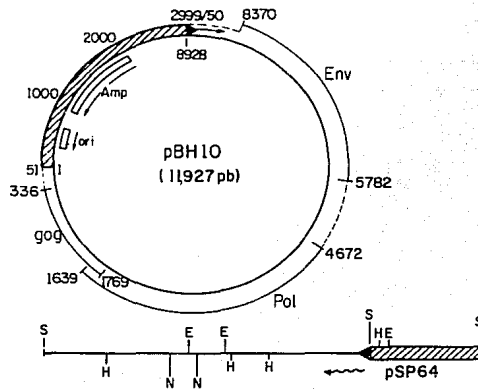
A partir del plásmido pBH10 de 11,927pb, se construyó el plásmido pBH4.3, que fue utilizado para sintetizar la ribosonda específica para la detección de secuencias del VIH 1. Para la construcción del pBH4.3, el DNA del plásmido pBH10 se cortó con la enzima Kpn I, la cual generó dos fragmentos de 5186 y 6741pb. El fragmento de 6741pb, se religó por incubación en presencia de la enzima DNA ligasa del bacteriofago T4, obteniéndose al plásmido pBH4.3 (ver el esquema de la construcción en la figura 2).

Este plásmido contiene la secuencia completa del LTR 5' y del gene gag, parte de la secuencia del gene pol y la región R y U3 del LTR 3' (ver figura 3-A).

El plásmido pBH4.3 fue sometido a un análisis por restricción con 5 diferentes enzimas con el fin de verificar que la construcción había sido correcta (ver figura 3-B). Las enzimas de elección se indican en el lado izquierdo de la figura, y en el lado derecho se muestra la fotografía del gel con los fragmentos generados con ella. El tamaño de los fragmentos obtenidos corresponde a los esperados, lo que corrobora que la construcción fue correcta; (comparar los fragmentos obtenidos con los sitios de corte mostrados en la figura 3-A).

A)

Restricción del plásmido pBH10



B)

- 1 λ - Hind III
- 2 pBH-10 s/c
- 3 pBH-10 Sac I
- 4 pBH-10 Hinc II
- 5 pBH-10 Nde I
- 6 pBH-10 Eco RI

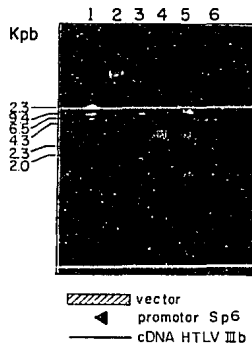


FIGURA 1.- RESTRICCIÓN DEL PLÁSMIDO pBH10.

(A) Mapa de restricción del plásmido pBH10 el cual contiene la secuencia nucleotídica completa del VIH 1 (HTLV IIIb) a excepción de la región R y US del LTR 5'. (B) Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% del plásmido pBH10 después de haber sido sometido a restricción con diferentes enzimas. Carril 1: Marcadores de peso molecular (DNA del fago Lambda digerido con la enzima Hind III). Carril 2: Plásmido pBH10 sin digerir. Carriles 3-6: Digestion del plásmido pBH10 con las enzimas Sac I, Hinc II, Nde I y Eco RI respectivamente.

Construcción del plásmido pBH 4.3

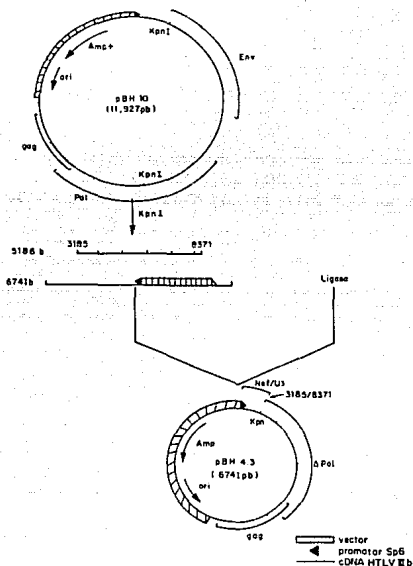
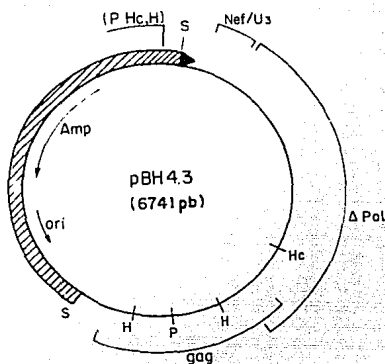


FIGURA 2.- ESQUEMA DE CONSTRUCCION DEL PLASMIDO pBH4.3

A partir de la digestión del plásmido pBH10 con la enzima *Kpn* I se obtuvieron dos fragmentos de 5186 y 6741pb. El fragmento mayor fue aislado y vuelto a ligar en presencia de la enzima DNA ligasa del fago T4, generándose de esta manera el plásmido pBH4.3 el cual contiene los genes que se señalan en el esquema (el LTR 5', parte de la secuencia de *pol* y del LTR 3' y la secuencia completa de *gag*).

A)

Restricción del plásmido pBH 4.3



B)

- 1 λ -Hind III
- 2 pBH 4.3
- 3 pBH 4.3 - Sac I
- 4 pBH 4.3 - Hind III (H)
- 5 pBH 4.3 - Pst I (P)
- 6 pBH 4.3 - Hinc II (Hc)
- 7 pGEM 4Z - Hae III

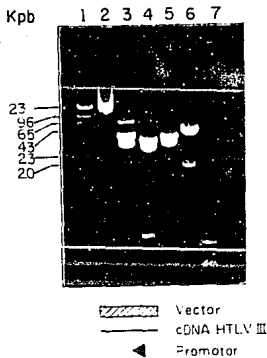


FIGURA 3.- RESTRICCIÓN DEL PLÁSMIDO pBH4.3

(A) Mapa de restricción del plásmido pBH4.3. (B) Electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, del plásmido pBH4.3 después de haber sido sometido a reacción con diferentes enzimas de restricción. Carril 1: Marcadores de peso molecular (DNA del fago Lambda digerido con la enzima Hind III). Carril 2: Plásmido pBH4.3 sin digerir. Carriles 3-6: digestión del plásmido pBH 4.3 con las enzimas Sac I (parcial), Hind III, Pst I y Hinc II respectivamente. Carril 7: Marcadores de peso molecular (DNA del plásmido pGEM4Z digerido con la enzima HaeIII).

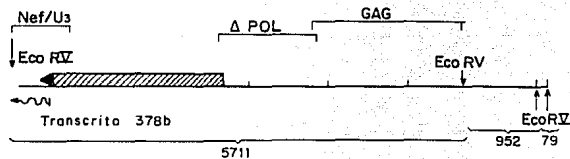
SINTESIS DE LA RIBOSONDA A PARTIR DEL PLASMIDO pBH4.3.

Una vez construido el plásmido pBH4.3, el siguiente paso fue el comprobar si podíamos llevar a cabo la síntesis de las ribosondas a partir de éste, y si esta era capaz de detectar por complementariedad las secuencias genómicas del VIH 1 en los extractos provenientes de células infectadas.

Para sintetizar las ribosondas, fue necesario digerir el plásmido pBH4.3 con la enzima de restricción Eco RV (ver figura 4-A). La enzima Eco RV tiene tres sitios de corte en el plásmido pBH4.3, y el que se localiza más cercano al promotor es el que posee el extremo 3' de la ribosonda (ver el esquema de la figura 4-A). El tamaño esperado para el transcrito fue de 378b, que es la distancia que existe entre el promotor de Sp6 y el sitio Eco RV.

En el carril 2 de la figura 4-B, se puede observar la migración electroforética en un gel de agarosa de las 3 bandas generadas a partir de la restricción del plásmido pBH4.3 con la enzima Eco RV. Los tamaños de estas fueron de 79, 952 y 5711pb, y es a partir de este último fragmento, denominado molde, que se llevó a cabo la síntesis de la ribosonda. Los fragmentos obtenidos de la restricción, fueron sometidos a la reacción de transcripción "in vitro" en presencia de la RNA polimerasa SP6, y al analizar la muestra por electroforesis en un gel de agarosa (ver carril 3 de la figura 4-B), se pudo detectar además de las bandas provenientes de la restricción del plásmido pBH4.3, la aparición de una banda de 378b que correspondía por tamaño a la banda de RNA esperada.

A)



B)

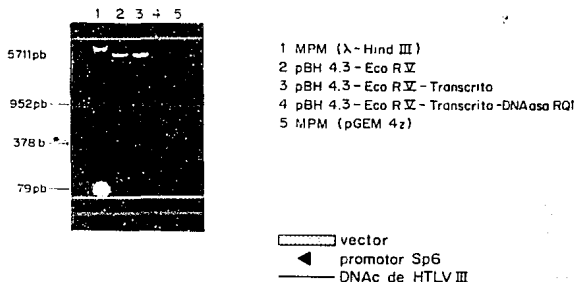


FIGURA 4.- ANALISIS POR ENSAYO DE TRANSCRIPCION "IN VITRO" DEL PLASMIDO pBH4.3.

(A) Mapa del plásmido pBH4.3 y sitios de corte de la enzima Eco RV. (B) Transcripción "in vitro" con el plásmido pBH4.3 en presencia de la polimerasa SP6. Los productos de digestión y transcripción fueron migrados en un gel de agarosa al 1.2 %. Carril 1: Marcadores de peso molecular (DNA del fago Lambda digerido con la enzima Hind III). Carril 2: Plásmido pBH4.3 digerido con la enzima Eco RV. Carril 3: Transcripción "in vitro" del DNA del plásmido pBH4.3 digerido con la enzima Eco RV. Carril 4: Muestra similar a la del carril 3, tratada con la enzima DNase RQ1. Carril 5: Marcador de peso (Plásmido pGEM 4z comercial).

Para comprobar que esta banda recién sintetizada era RNA, la muestra sometida a la reacción de transcripción "in vitro" fue tratada con la enzima DNAasa RQ1, y migrada electroforéticamente en un gel de agarosa (carril 4 de la figura 4-B) en donde podemos observar la desaparición de las bandas de DNA, y no así la banda de RNA recién sintetizada de 378b. Estos ensayos nos permitieron contar con la síntesis de moléculas de RNA a partir del DNA complementario del VIH 1 clonado en el plásmido pBH4.3.

La ribosonda de 378b, corresponde al extremo 3' terminal del genóma del VIH 1 (HTLV IIIb) que contiene parte del gene NEF y una pequeña región de los repetidos largos terminales (LTR). Esta región, esta contenida en los tres transcritos (RNA m) del VIH que se han reportado presentes en las etapas tempranas (de 2.0 Kb) o tardías (4.3 y 9.2 Kb) de la infección (ver figura B) por lo que la ribosonda en teoría debe ser capaz de detectar por complementariedad cualquier transcrito que pudiera generarse en las células infectadas con el VIH 1 (Cullen, B.R., 1991. Greene, W.C., 1991); Cullen, B.R. y col., 1990).

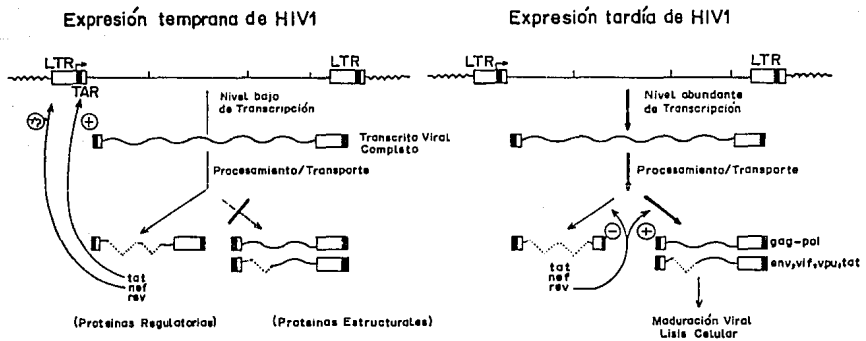


FIGURA D.- REGULACION DE LA EXPRESION GENICA DEL VIH.

Los factores transcripcionales celulares son mediadores de un bajo nivel de transcripción inicial que resulta en la expresión de las proteínas reguladoras virales. La proteína Tat actúa sobre TAR (elemento de respuesta a la transactivación) para amplificar a altos niveles la expresión de todos los productos genicos virales. La proteína Rev induce la transición de esta fase temprana de regulación, hacia una fase tardía de expresión genica mediante la síntesis de grandes cantidades de proteínas estructurales virales.

DETECCION DE SECUENCIAS DEL VIH 1 MEDIANTE EL USO DE RIBOSONDAS.

Una vez construida la ribosonda, se necesitaba probar que ésta era realmente capaz de hibridar con los transcritos virales provenientes de células infectadas con el VIH 1.

Para ello, se utilizaron cultivos "in vitro" de células molt no infectadas e infectadas con el VIH 1 (HTLV IIb), obtenidas en el laboratorio de la Dra. Carmen Soler, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, México, D.F.

Ambos cultivos se procesaron a través de diferentes metodologías (ver materiales y métodos) para obtener extractos de RNA total, y después de su cuantificación se procedió a fijarlos a papel de nitrocelulosa mediante la metodología de transferencia en franja (ver materiales y métodos). Una vez realizado lo anterior, el papel se hibridó con la ribosonda de 378b, (que fue sintetizada en presencia de UTP- α P32).

Los resultados obtenidos se muestran por duplicado en la autorradiografía de la figura 5-A, en donde se puede observar una señal en el carril que corresponde a $1\mu\text{g}$ de RNA (proveniente de 500,000 células). Esta señal, se fue haciendo mas evidente a medida que se incrementó la cantidad de RNA, en 2 y 5 μg que corresponden a 1 millon y 2.5 millones de células infectadas respectivamente.

En las muestras de RNA provenientes de células no infectadas, a diferencia de las infectadas, se observa una señal muy débil que se mantiene constante a pesar del incremento en la cantidad de RNA

total de 1 a 5 veces (tres últimas muestras). Estos resultados fueron corroborados después de cuantificar y graficar la radiactividad incorporada en cada pozo del papel, como puede observarse en la figura 5B.

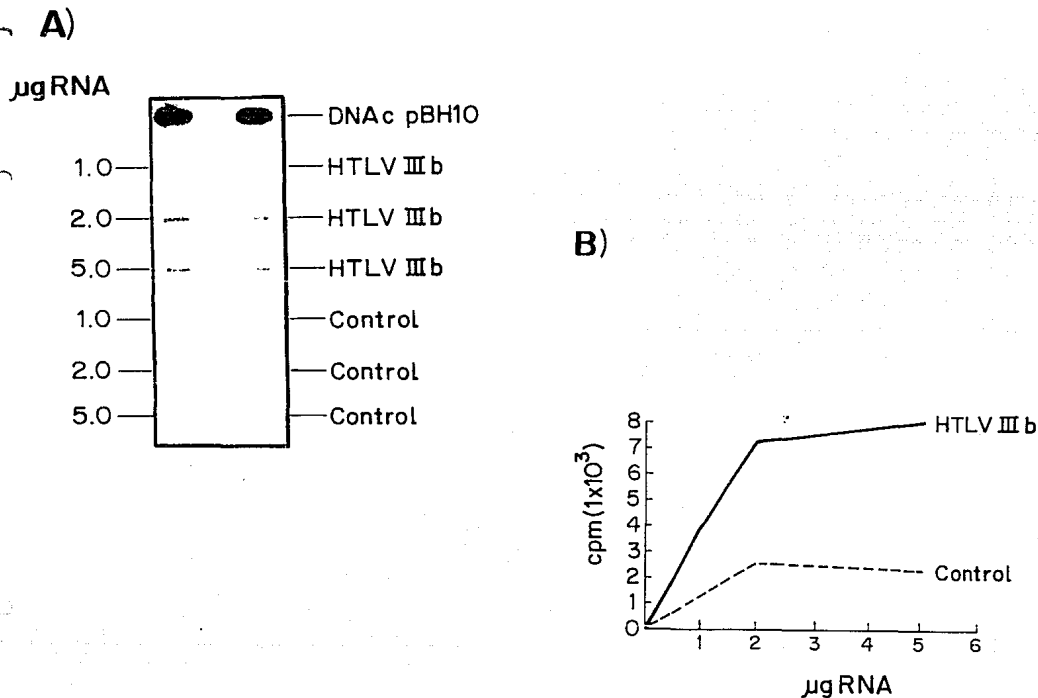


FIGURA 5.- HIBRIDACION TIPO FRANJA DEL RNA DE CELULAS INFECTADAS CON EL VIH.

(A) se muestra la autorradiografía de la transferencia tipo franja de RNA obtenido de células no infectadas (control) e infectadas con el VIH 1 (HTLV IIIb), e hibridada con la ribosonda proveniente del plásmido pBH4.3 (ver figura 4). En el lado izquierdo de la figura se indican las cantidades de RNA fijadas al filtro de nitrocelulosa, en duplicados de la muestra. La actividad específica de la ribosonda fue 1.5×10^6 cpm/µg de RNA; el lavado de los filtros se llevó a cabo a alta severidad (ver materiales y métodos), y su exposición fue de tres días. (B) Se muestra de manera cuantitativa los resultados de la figura 5-A. Células infectadas con VIH 1 (----), células no infectadas (- - -). 1µg de RNA corresponde aproximadamente a 5×10^5 células.

Los datos anteriores sugerían por un lado, la existencia de secuencias probablemente de origen celular con las cuales se presentaba hibridación cruzada de la ribosonda (ya que los controles negativos presentaron hibridación) y por otro que esta señal siempre fue menor a la encontrada con el RNA proveniente de lisados infectados.

Con la finalidad de corroborar estos resultados, se repitió el ensayo aumentando la concentración de RNA de las células infectadas y no infectadas de 1 a 6 μg . Los resultados obtenidos fueron similares a los anteriores, (ver figura 6) observándose nuevamente un incremento en la intensidad de la señal a medida que aumentaba la concentración de RNA proveniente de células infectadas, no siendo así con el RNA proveniente de las células moltiplicadas o de linfocitos humanos normales no infectados en donde la señal observada se sigue presentando muy débil y constante independientemente de la concentración de RNA utilizado. En este ensayo, se analizaron también extractos de RNA proveniente de células infectadas con el VIH 1 (MN) (heterólogo), en concentraciones de 1 a 6 μg (ver figura 6) y los resultados fueron similares, salvo que la intensidad de las señales tanto en el RNA proveniente de células infectadas como en el de células no infectadas se mostró mas débil con respecto a la señal de los ensayos con VIH 1 (HTLV IIIb) (homólogo).

Este menor reconocimiento se debe a que la ribosonda que se utilizó para detectar las secuencias genómicas (378b) no corresponde totalmente a la secuencia del VIH 1 (MN).

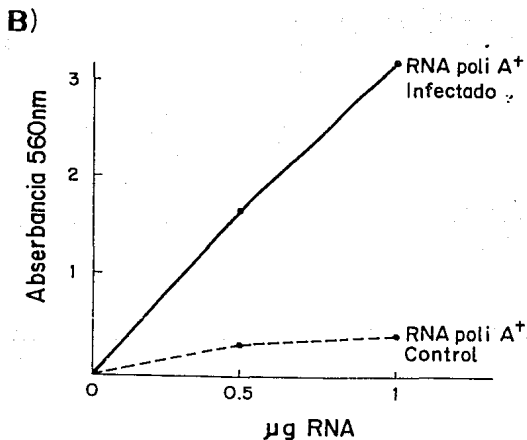
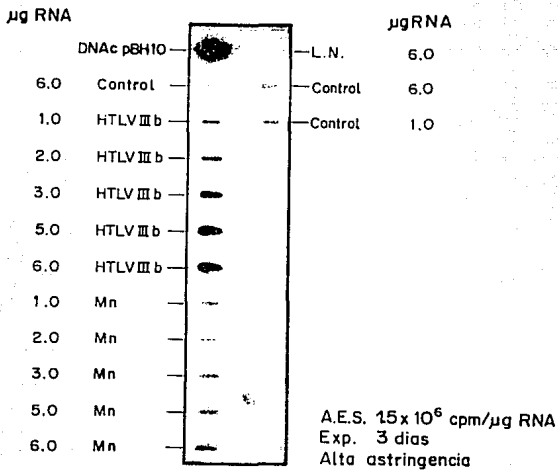


FIGURA 6.- HIBRIDACION TIPO FRANJA DE RNA DE CELULAS INFECTADAS CON EL VIH 1 (HTLV IIIb Y MN).

Autorradiografía de la transferencia e hibridación de RNA proveniente de células no infectadas e infectadas con el VIH 1 (cepas Mn y HTLV IIIb) con la ribosonda generada a partir del plásmido pBH 4.3. En el lado izquierdo de la figura se indican las cantidades de RNA y la cepa del virus utilizada en la infección, así como el DNA utilizado como control positivo. En el lado derecho se indican las cantidades de RNA proveniente de células molt y linfocitos de humano no infectados. La actividad específica de la ribosonda fue de 1.5×10^6 cpm/µg de RNA, el filtro fue lavado a alta severidad y expuesto tres días.

Para determinar si el reconocimiento cruzado con las secuencias de RNA celular correspondía a secuencias de RNA mensajeros celulares o a RNA ribosomal (reportado como una de las causas que puede provocar este fenómeno), se decidió separar del RNA total al RNA poli A+ (RNAs mensajeros) del RNA poli A- (RNA ribosomal y RNA de transferencia) (ver materiales y métodos). Los resultados pueden verse en la autorradiografía de la figura 7, en donde se muestran cantidades de 0.5 y 1µg de extracto total, de RNA poli A+, y de RNA poli A- proveniente de células infectadas y no infectadas que fueron hibridadas con la ribosonda de 378b.

Las señales más prominentes corresponden a los controles positivos (secuencias del plásmido pBH10). Los resultados con el RNA proveniente de extractos totales muestran un comportamiento similar al obtenido anteriormente, mientras que con los extractos de RNA poli A+, solamente se observa la hibridación en los carriles con RNA proveniente de células infectadas, y no así en el proveniente de células no infectadas, en donde la hibridación no es detectable. (Los valores de estos resultados obtenidos por espectrofotometría de la autorradiografía pueden observarse graficados en la figura 7-B). Sin embargo, al analizar los extractos de RNA poli A-, se observa que tanto el RNA proveniente de células infectadas, como el de células no infectadas, se detecta una señal de hibridación tenue y de aproximadamente igual intensidad independientemente de la concentración. Esto sugiere que la hibridación obtenida con los RNAs de células no infectadas

corresponde a una hibridación con el RNA ribosomal.

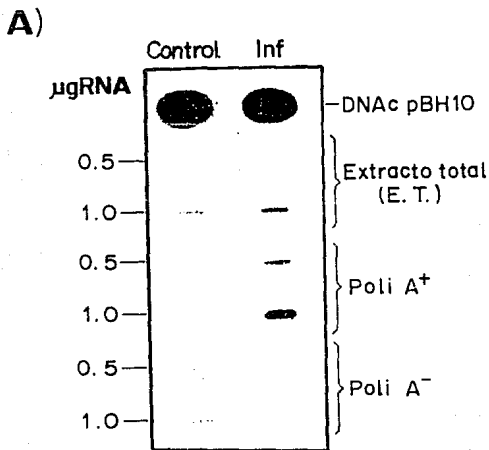


FIGURA 7.- HIBRIDACION TIPO FRANJA DE RNA POLI A⁺ Y POLI A⁻ DE CELULAS INFECTADAS CON EL VIH 1.

(A) Autorradiografía de la transferencia tipo franja e hibridación del RNA total, poli A⁺ y Poli A⁻ obtenido a partir de células no infectadas (control) e infectadas con el VIH 1 (HTLV IIIb) con la ribosonda sintetizada a partir del plásmido pBH4.3. En la parte izquierda de la figura se indican las cantidades de RNA utilizadas en los ensayos, y del lado derecho se indican las poblaciones de RNA. (B) Análisis densitométrico a 560 nm de cada uno de los valores obtenidos de la hibridación con el RNA poli A⁺ de la figura 7-A. RNA poli A⁺ de células infectadas (-----) y RNA poli A⁺ de células no infectadas (- - -). Los ensayos de hibridación se llevaron a cabo utilizando una ribosonda con una actividad específica de 2.3×10^6 cpm/µg de RNA. Los lavados fueron a alta severidad y la exposición del filtro fue de tres días.

Para corroborar de manera precisa si la hibridación obtenida con el RNA de células no infectadas era debida a una hibridación con el RNA ribosomal, se hizo un ensayo de transferencia tipo Northern en el cual las poblaciones de RNA fueron separadas por tamaño mediante una electroforésis en un gel desnaturalizante de agarosa, (ver materiales y métodos). Una vez separados, los RNAs fueron transferidos a papel de nitrocelulosa e hibridados de manera similar a la descrita anteriormente. Los resultados de este ensayo se muestran en la autorradiografía de la figura 8. Al analizar los resultados del RNA proveniente de los extractos totales (ver carriles 2 y 3), pudimos observar que existe al igual que en los ensayos de transferencia en franja, una señal de hibridación tanto en las muestras de RNA proveniente de células infectadas como en el de células no infectadas. El tamaño de las dos bandas detectadas fue de 2.0 y 4.3 kb, que corresponden en tamaño a los RNA ribosomales (1.9 y 4.3 Kb). En el caso de los RNA provenientes de células infectadas, se puede observar una señal de hibridación un poco mayor, que se debe a que los RNA mensajeros virales tienen una migración electroforética similar a la de lo RNA ribosomales, lo que por otro lado, hace muy difícil mediante este sistema su separación. A diferencia de lo anterior, cuando se utilizó la técnica de separación de los RNA poli A+ del resto de los RNAs (ver carriles 4 y 5) las bandas detectadas en el carril con extractos provenientes de células infectadas evidentemente correspondieron a los RNA mensajeros del VIH, (carril 4) ya que fueron del tamaño reportado, y además no se detectan en los extractos provenientes de

células no infectadas (carril 5).

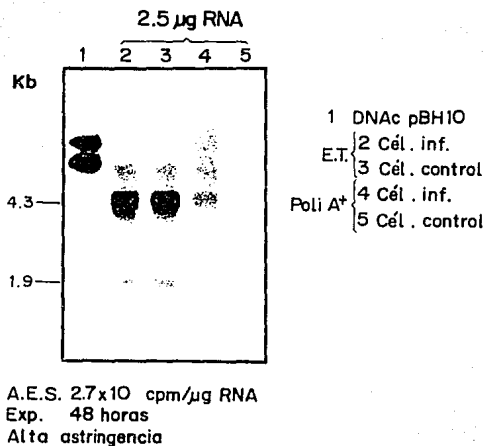


FIGURA 8.- TRANSFERENCIA TIPO NORTHERN DE LAS POBLACIONES DE RNA DEL VIH 1.

En esta figura se muestra la autorradiografía del ensayo de transferencia de RNA total y RNA poli A+, provenientes de células no infectadas (control) e infectadas con el VIH 1 (HTLV IIb), e hibridado con la ribosonda proveniente del plásmido pBH4.3. La actividad específica de la ribosonda fue de 2.7×10^5 cpm/µg de RNA. Los papeles fueron lavados a alta severidad y expuestos 48 horas. Carril 1: DNA del plásmido pBH10. Carril 2: RNA citoplásmico total de células infectadas. Carril 3: RNA citoplásmico total de células no infectadas. Carriles 4 y 5: RNA poli A+ proveniente de células infectadas y no infectadas respectivamente.

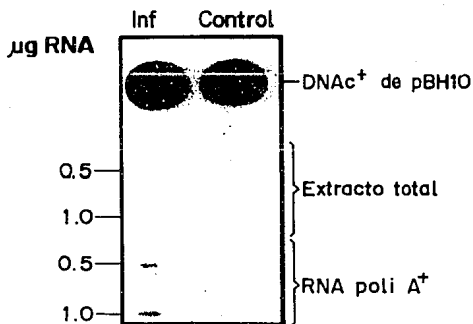
Este resultado se debe a que mediante esta metodología pudieron separarse las fracciones de RNA poli A+, en donde se encuentran los mensajeros virales, de las fracciones de RNA poli A-, en donde se encuentran los RNA ribosomales.

Muestras similares a las anteriores fueron utilizadas para un ensayo de transferencia en franja (ver figura 9), en donde se puede observar claramente que la señal en los extractos de RNA poli A+ provenientes de células infectadas es específica del virus, ya que en el RNA poli A+ proveniente de células no infectadas no hay hibridación con la sonda, lo que no sucede en los extractos totales en donde la hibridación con células infectadas y no infectadas es muy similar.

DISEÑO Y CONSTRUCCION DE LOS PLASMIDOS CON SECUENCIAS DEL VIRUS DE LA POLIOMIELITIS.

El plásmido pGEM4Z-VP2 fue construido por la Dra. Rosa Ma. del Angel, del CINVESTAV, México, de la misma manera que se construyeron los plásmidos con secuencias del VIH 1.

En el plásmido pGEM4Z fue insertada una región de 309pb que corresponde a los nucleótidos 1414 a 1723 del genoma del virus de la poliomielitis cepa Lansing serotipo 2 y que codifica para la proteína VP2 (ver figura 10-A).



A.E.S. 2.7×10^6 cpm/ μ g RNA
 Exp. 36 horas
 Alta astringencia

FIGURA 9.- HIBRIDACION TIPO FRANJA DE RNA POLI A+ OBTENIDO DE CELULAS INFECTADAS CON EL VIH 1.

El RNA citoplásmico proveniente de células molt no infectadas (control) e infectadas con el VIH 1 (HTLV 111b) se fijó a papel de nitrocelulosa y se hibridó con la ribosonda proveniente del plásmido pBH4.3. En la parte izquierda de la figura se indican las cantidades de RNA utilizadas en cada uno de los ensayos, y del lado derecho se señalan las poblaciones de RNA. La ribosonda presentó una actividad específica de 2.7×10^6 cpm/ μ g de RNA. El filtro fue lavado en condiciones de alta severidad y expuesto durante 36 horas.

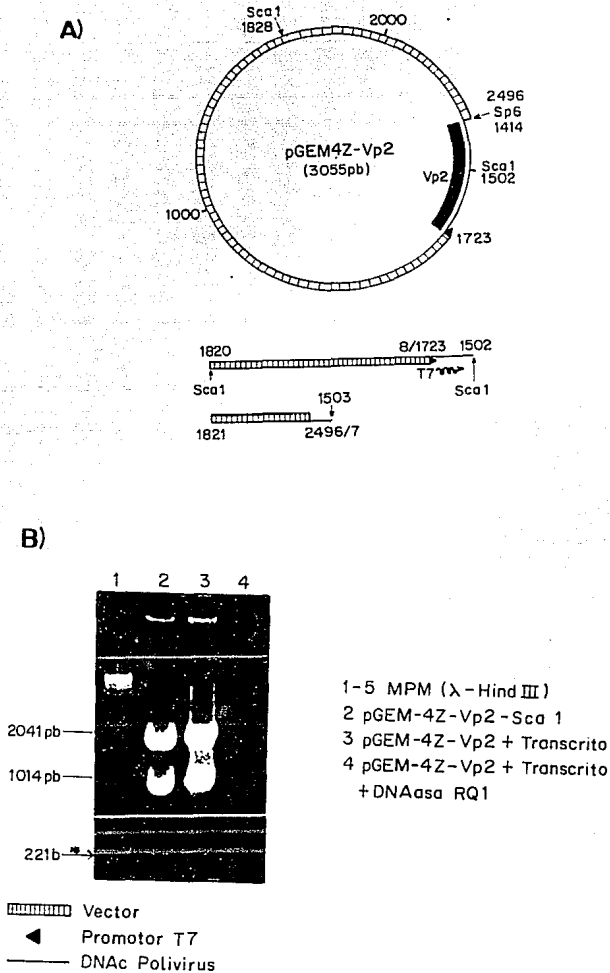


FIGURA 10.- TRANSCRIPCIÓN "IN VITRO" DEL PLÁSMIDO pGEM4Z-VP2.

(A) Mapa de restricción del plásmido pGEM4Z-VP2 que contiene la región de la proteína VP2 del virus de la poliomielitis. (B) Patrón de migración del plásmido en geles de agarosa al 1.0% después de haber sido sometido a restricción con la enzima Sca I, y a un ensayo de transcripción "in vitro". Carril 1 y 5: Marcadores de peso molecular (DNA del fago Lambda digerido con la enzima Hind III). Carril 2: Plásmido pGEM4Z-VP2 digerido con la enzima Sca I. Carril 3: Transcripción "in vitro" de una muestra similar a la del carril 2. Carril 4: Muestra similar a la del carril 3 sometida a reacción con la enzima DNasa RQ1.

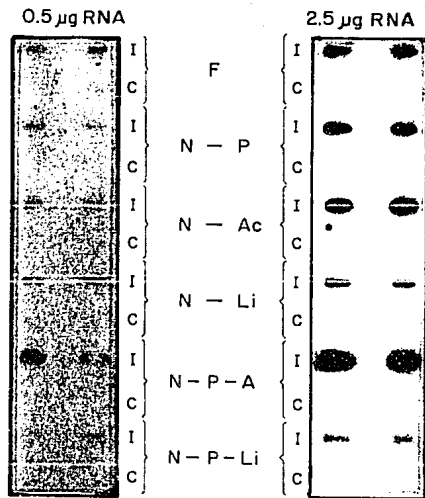
SINTESIS DE LA RIBOSONDA A PARTIR DEL PLASMIDO pGEM4Z-VP2.

Una vez obtenido el plásmido pGEM4Z-VP2 de 3055pb, fue sometido a una reacción de restricción con la enzima Sca I, con la finalidad de obtener un molde de DNA a partir del cual pudieramos sintetizar la ribosonda. Los fragmentos generados de la reacción de restricción corresponden a un tamaño de 2041 y 1014 pb (ver carril 2 de la figura 10-B), y es a partir del primero que se llevó a cabo la síntesis de la ribosonda.

Los fragmentos generados de la restricción del plásmido pGEM 4Z-VP2 con la enzima Sca I, fueron sometidos a una reacción de transcripción "in vitro" en presencia de la RNA polimerasa T7, y al analizar el resultado de la reacción por electroforesis en gel de agarosa, (ver carril 3 de la figura 10-B) se detecta además de las bandas de DNA, una banda recién sintetizada que corresponde en tamaño (221b) al transcrito esperado. Para corroborar que esta banda fuera realmente RNA, la muestra anterior se sometió a una reacción con la enzima DNAasa RQ1, que degradó al DNA, y no así a la banda recién sintetizada (ver carril 4 de la figura 10-B) lo que permitió asegurar que ésta corresponde a la ribosonda de 221b.

**DETECCION DE SECUENCIAS GENOMICAS DEL VIRUS DE LA POLIOMIELITIS
MEDIANTE EL USO DE RIBOSONDAS.**

Una vez construida la ribosonda, se quiso probar si ésta realmente era capaz de detectar secuencias genómicas del virus de la poliomielitis en extractos de células infectadas. Para ello, se utilizaron cultivos de células HeLa infectadas durante 5 horas con el virus de la poliomielitis cepa Lansing tipo 2 y células HeLa no infectadas, de las cuales se obtuvo el RNA total a través de diferentes metodologías de extracción (ver Materiales y Métodos). En la figura 11, se muestran dos autorradiografías de ensayos de transferencia tipo franja (que fueron hibridadas con la ribosonda de 221b sintetizada en presencia de UTP- α P32), una de ellas con 0.5 μ g de muestra, y la otra con 2.5 μ g. En ambas autorradiografías podemos observar la hibridación en aquellas muestras de RNA provenientes de células infectadas con el virus de la poliomielitis, y no así en aquellas provenientes de células no infectadas (en todos los casos las muestras están por duplicado). Este fenómeno ocurre de la misma manera en todas las muestras, independientemente de la metodología de extracción, y de la cantidad de muestra utilizada. Es importante hacer notar que con la metodología de N-P-A (ver materiales y métodos) la hibridación es más clara que con el resto de las estrategias de aislamiento de RNA.



A.E.S. 2.3×10^6 cpm/µg RNA
 Exp. 36 horas
 Alta astringencia

FIGURA 11.- HIBRIDACION TIPO FRANJA DE RNA DE CELULAS INFECTADAS CON EL VIRUS DE LA POLIOMIELITIS.

En esta figura se muestra la autorradiografía de la transferencia de RNA obtenido de células HeLa no infectadas (C) e infectadas con el virus de la poliomielitis (I) e hibridado con la ribosonda proveniente del plásmido pGEH4Z-VP2. El RNA citoplásmico total fue aislado a través de diferentes metodologías: F: Extracción fenólica; N-P: Extracción con Nonidet y Proteinasa K; N-Ac: Extracción con Nonidet y precipitado con acetato de sodio; N-Li: Extracción con Nonidet y precipitado con cloruro de Litio; N-P-Ac: Extracción con Nonidet, Proteinasa K y precipitado con acetato de sodio; N-P-Li: Extracción con Nonidet, Proteinasa K y precipitado con cloruro de litio. La actividad específica de la ribosonda fue de 2.3×10^6 cpm/µg de RNA. Los papeles fueron lavados a alta severidad y expuestos durante 36 horas. Las muestras fueron corridas por duplicado.

Para corroborar que la hibridación entre las secuencias genómicas del poliovirus y la ribosonda de 221 b era específica, se llevó a cabo un ensayo de transferencia tipo Northern que confiere la ventaja de poder determinar el tamaño de los transcritos detectados con ella. El resultado del ensayo puede observarse en la autorradiografía de la figura 12. En el carril 1 que corresponde a los extractos de RNA obtenidos de células no infectadas, no se detectó por hibridación con la ribosonda de 221b ninguna banda, mientras que en el carril 2, en donde se migró al RNA proveniente de células infectadas, se detectó una banda de RNA que corresponde a un tamaño de aproximadamente 7.5 Kb, siendo éste el tamaño descrito del RNA mensajero viral de Poliovirus (Stanway, G., 1990. Sarnow, S.J. y col. 1990). Con esto, podemos concluir que esta banda corresponde al RNA mensajero del virus de la poliomielitis, cuya detección fue posible mediante la hibridación por complementación con la ribosonda de 221 b.

DISEÑO Y CONSTRUCCION DE LOS PLASMIDOS CON SECUENCIAS DEL VIRUS DEL DENGUE.

En el caso de la elaboración de ribosondas con el fin de detectar secuencias genómicas del virus del dengue, se utilizó el plásmido pGEM 30 que fue construido por la M. en C. Elena Castro R. del Cinvestav, Mexico. Este contiene una parte del genoma del virus del dengue clonada en el plásmido pGEM4Z, que comprende la secuencia completa que codifica a las proteínas NS1, NS2a y NS2b, y parte de la secuencia que codifica a las proteínas E y NS3 (ver figura 13-A).

El plásmido pGEM 30, de 5555pb fue analizado con diferentes enzimas de restricción, en donde los fragmentos generados por estas correspondieron a los reportados con anterioridad (ver figura 13-B).

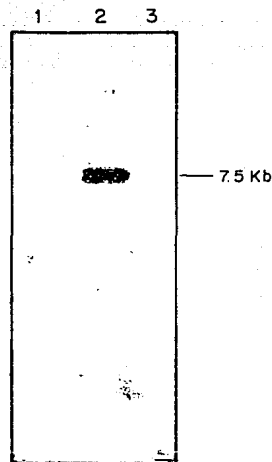
A



Gel de transferencia tipo Northern blot

1-RNA control
2-RNA infectado
3-MPM

B

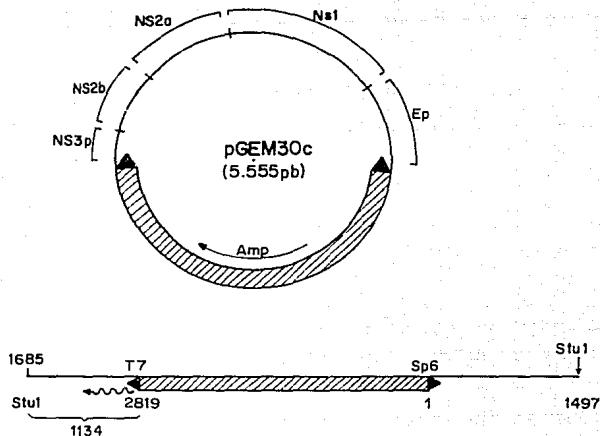


Autorradiografía de la transferencia tipo Northern blot

FIGURA 12.- TRANSFERENCIA TIPO NORTHERN DE LA POBLACION DE RNA DEL VIRUS DE LA POLIOMIELITIS.

(A) Electroforésis en un gel desnaturalizante de agarosa al 1.2% y formaldehído del RNA proveniente de células no infectadas (1) e infectadas con el virus de la poliomielitis (2). El carril 3 corresponde a los marcadores de peso molecular (RNA ribosomal de células HeLa). (B) Autorradiografía de la transferencia del gel del inciso A hibridado con la ribosonda proveniente del plásmido pGEM42-VP2. La actividad específica de la ribosonda utilizada fue de 2.3×10^6 cpm/ μ g de RNA. El filtro fue lavado a alta severidad. En el lado derecho de la figura se señala la posición del RNA del virus de la poliomielitis que tiene un tamaño aproximado de 7.5kb.

A)



B)

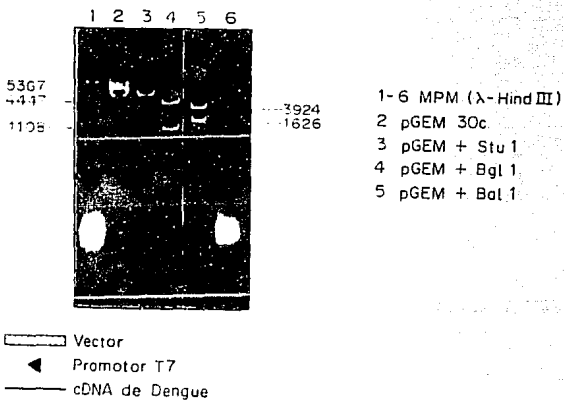


FIGURA 13.- RESTRICCIÓN DEL PLÁSMIDO pGEM 30c.

(A) Mapa de restricción del plásmido pGEM 30c en el cual se encuentran señaladas las posiciones de algunos de los genes del virus del dengue. (B) Migración electroforética del plásmido en un gel de agarosa al 1.0% después de haber sido sometido a restricción con diferentes enzimas. Carril 1 y 6: Marcadores de peso molecular (DNA del fago Lambda digerido con la enzima Hind III). Carril 2: Plásmido pGEM 30c sin cortar. Carriles 3-5: Plásmido pGEM 30c digerido con las enzimas Stu I, Bgl I y Bal I respectivamente.

**SINTESIS DE LA RIBOSONDA DEL VIRUS DEL DENGUE A PARTIR DEL
PLASMIDO pGEM 30.**

Para llevar a cabo la síntesis de la ribosonda del virus del dengue, el plásmido pGEM 30 fue restringido con la enzima Stu I, resultando dos fragmentos de 5367 y 188 pb que fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa, (ver carril 2 de la figura 14). Una vez obtenidos los fragmentos, estos fueron sometidos a una reacción de transcripción "in vitro", durante la cual se sintetizó un transcrito de 1134b (a partir del molde de 5367pb) que corresponde a la ribosonda del virus del dengue, serotipo 4, y que puede observarse en el carril 3 de la figura 14. La muestra de transcripción fue sometida a digestión con la enzima DNAasa RQ1, degradándose la banda correspondiente al molde y a la de 188 pb de DNA, y no así la banda recién generada que corresponde al transcrito (ribosonda) (ver carril 4 de la figura 14).

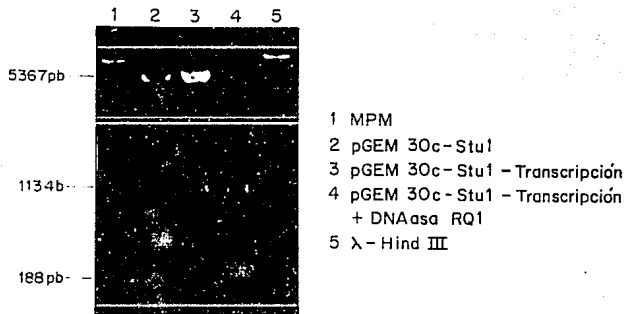


FIGURA 14.- TRANSCRIPCIÓN "IN VITRO" DEL PLASMIDO pGEM 30c.

El plásmido pGEM 30c fue digerido con la enzima Stu I y posteriormente sometido a una reacción de transcripción "in vitro" en presencia de la polimerasa T7. Carriles 1 y 5: Marcadores de peso molecular (DNA del fago Lambda digerido con la enzima Hind III). Carril 2: Plásmido pGEM 30c digerido con la enzima Stu I. Carril 3: Una muestra similar a la del carril 2 pero sometida a la reacción de transcripción "in vitro". Carril 4: Una muestra similar a la del carril 3 pero tratada con la enzima DNasa RQ1.

**DETECCION DE SECUENCIAS DEL VIRUS DEL DENGUE MEDIANTE EL USO
DE RIBOSONDAS.**

Una vez sintetizada la ribosonda de 1134b del virus del dengue, fue probada en un ensayo de transferencia en franja con muestras del RNA total obtenido de células infectadas y no infectadas con el virus del dengue a 24, 48 y 72 horas post-infección.

Los resultados de este ensayo pueden verse en la autorradiografía de la figura 15; en ella se muestra claramente la existencia de una señal de hibridación en los carriles correspondientes a los extractos de RNA provenientes de células infectadas. Cabe hacer notar que esta señal es mas intensa en las células procesadas a las 48 horas postinfección, que en el caso de las células procesadas a las 24 y 72 horas postinfección.

A diferencia de lo que ocurió con el virus de la poliomiелitis, en los extractos de RNA obtenidos a partir de células no infectadas con el virus del dengue, se observa una señal muy débil que permanece con la misma intensidad en los tres diferentes tiempos de extracción. Esto nos hizo pensar que podía tratarse del mismo fenómeno que ocurrió en el caso de los ensayos de extracto total de RNA de células infectadas con el VIH 1 (hibridación cruzada con los RNA ribosomales).

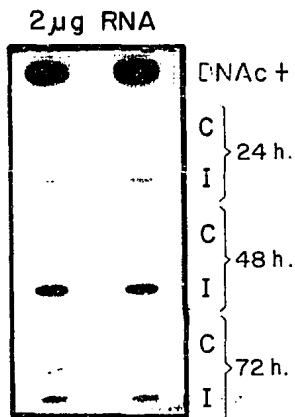


FIGURA 15.- HIBRIDACION TIPO FRANJA DE RNA DE CELULAS INFECTADAS CON EL VIRUS DEL DENGUE SEROTIPO 4.

En la figura se muestra la autorradiografía del ensayo de hibridación, en el cual se utilizaron 2 μ g de RNA obtenido de células CV-1P no infectadas (C) e infectadas con el virus del dengue serotipo 4 (I). Este fue extraído a diferentes tiempos post-infección (24, 48 y 72 hrs) e hibridado con la ribosonda generada del plásmido pGEM 30c, cuya actividad específica fue de 2.5×10^6 cpm/ μ g de RNA. Los filtros fueron lavados en condiciones de alta severidad y expuestos durante 18 horas.

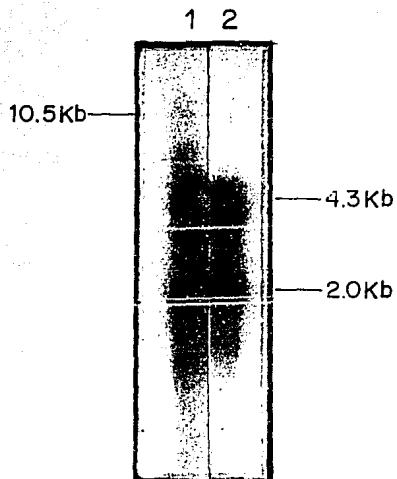
Para corroborar lo anterior, las muestras fueron analizadas en un ensayo de transferencia tipo Northern, (figura 18), en donde se observa una hibridación que corresponde en tamaño a los RNA ribosomales de la misma intensidad tanto en RNA de células infectadas como en el de las células no infectadas. Además de esto, en el carril que corresponde a las células infectadas (carril 1) encontramos una banda de aproximadamente 10.5 Kb, que no aparece en el carril con la muestra de RNA de células no infectadas, que corresponde por tamaño al RNA de dengue (Rice, C.M. y cols., 1985).

Debido a que la ribosonda de 1134b presentaba el problema de hibridar con algunas secuencias de origen celular, decidimos construir una ribosonda de otra región del DNA complementario de dengue, que además fuera más pequeña, con el fin de reducir o evitar completamente esta hibridación cruzada. Para el caso de este virus no podíamos separar a la población de RNA ribosomal bajo los mismos parámetros que los que utilizamos para la separación de los RNA mensajeros del VIH 1 (separación de las poblaciones de RNA poli A+), ya que el virus del dengue carece de estructura poli A en el extremo 3' de sus RNA mensajeros.

A partir del plásmido pGEM 30, se construyó el plásmido pDE, que sirvió como molde para la construcción de la nueva ribosonda para la detección de secuencias genómicas del virus del dengue.

El plásmido pDE fue construido mediante la restricción del plásmido pGEM 30 con la enzima de restricción Hinc II, que generó tres fragmentos de 225, 2029 y 3301 pb. El fragmento de 3301 pb fue aislado e incubado con la enzima DNA ligasa del fago T4, (ver

materiales y métodos) obteniéndose así al plásmido pDE.



1 RNA de células infectadas
2 RNA de células control

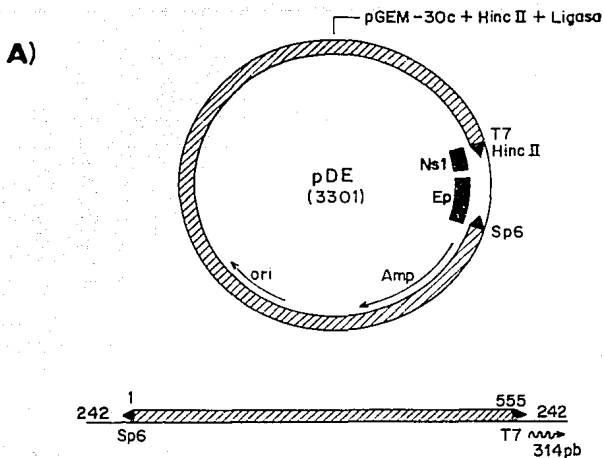
FIGURA 18.- HIBRIDACION TIPO NORTHERN DE LAS POBLACIONES DE RNA DEL VIRUS DEL DENGUE.

En la figura se muestra la autorradiografía del ensayo de transferencia tipo Northern con RNA proveniente de células CV-1P no infectadas (2) e infectadas con el virus del dengue serotipo 4 (1), hibridado con la ribosonda proveniente del plásmido pGEM 30. La actividad específica de ésta fue de 2.0×10^5 cpm/ μ g de RNA. El filtro fue lavado en condiciones de alta severidad y expuesto 18 hrs.

El plásmido pDE de 3301pb, que presenta parte de las secuencias que codifican a las proteínas NS1 y E, fue sometido a un análisis por restricción con diferentes enzimas con el fin de verificar si la construcción había sido correcta (ver figura 16-B). Una vez validado el plásmido pDE, este se sometió a restricción con la enzima Hae III con la que se generó el molde de 587 pb además de varias bandas de DNA de diferentes pesos moleculares (carril 5 de la figura 16). Este molde fue sometido a una reacción de transcripción "in vitro", en la cual se sintetizó a la ribosonda de 314b.

La autorradiografía de esta hibridación puede observarse en la figura 17, en donde tenemos 2 μ g de RNA total extraído de células infectadas y no infectadas a 24, 48 y 72 horas.

Como podemos observar, los resultados fueron similares a los obtenidos con la ribosonda de 1134 b de dengue (ver figura 15). En el RNA proveniente de células infectadas aparece nuevamente una señal de intensidad aproximadamente igual a la obtenida con la sonda de 1134b, y en el RNA proveniente de las células no infectadas una señal menos evidente, sin embargo el fondo de hibridación con el RNA de las células no infectadas no pudo eliminarse. De la misma manera, las muestras, fueron también analizadas mediante un ensayo de transferencia tipo Northern hibridado con la ribosonda de 314b, y al igual que con la ribosonda de 1134b, se pudo detectar al RNA mensajero del virus del dengue en los extractos de RNA proveniente de células infectadas y no así en los provenientes de células no infectadas.



B)

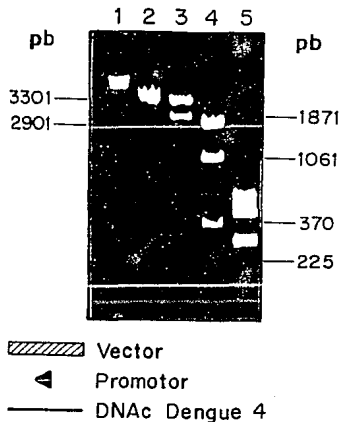


FIGURA 16.- RESTRICCIÓN DEL PLÁSMIDO pDE.

(A) Mapa de restricción del plásmido pDE que contiene las secuencias parciales de los genes NS1 y E del virus del dengue serotipo 4. En la parte inferior de este mismo inciso se muestra el tamaño de la ribosonda esperada una vez que el plásmido ha sido restringido y sometido a un ensayo de transcripción "in vitro". (B) Migración electroforética del plásmido en un gel de agarosa al 1.2% después de ser sometido a una reacción de restricción. Carril 1: Marcadores de peso molecular. (DNA del fago Lambda digerido con la enzima Hind III). Carril 2: Plásmido pDE sin digerir. Carril 3: Plásmido pGEM 30c digerido con la enzima Hinc II. Carriles 4 y 5: Plásmido pDE digerido con las enzimas Hae II y Hae III respectivamente.

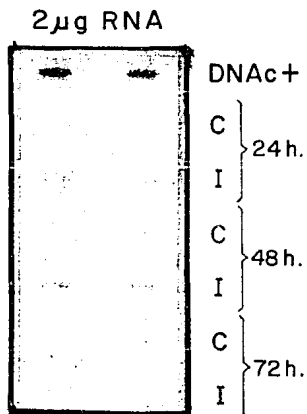


FIGURA 17.- HIBRIDACION TIPO FRANJA DE RNA DE CELULAS INFECTADAS CON EL VIRUS DEL DENGUE SEROTIPO 4.

En la figura se muestra la autorradiografía de una transferencia de RNA obtenido de células CV-1P no infectadas (C) e infectadas con el virus del dengue serotipo 4 (I) extraído a diferentes tiempos postinfección (24, 48 y 72 Hrs), e hibridado con la ribosonda proveniente del plásmido pDE. La actividad específica de la ribosonda fue de 2.0×10^6 cpm/ μ g de RNA. Los filtros fueron lavados a alta severidad y expuestos durante 18 hrs.

ANALISIS DE RESULTADOS

DISEÑO Y CONSTRUCCION DE LOS PLASMIDOS CON LAS SECUENCIAS DE VIH 1 POLIOVIRUS Y VIRUS DEL DENGUE.

Con el fin de sintetizar una ribosonda para detectar secuencias genómicas del VIH 1 en células infectadas, se construyó al plásmido pBH4.3, derivado del plásmido pBH10. El plásmido pBH4.3, fue sometido a un ensayo de restricción con la enzima Eco RV, en donde se generó un molde de 5711pb, que a su vez fue sometido a un ensayo de transcripción "in vitro" en presencia de α -UTP P32. A partir de este último ensayo, se obtuvo la ribosonda de 378b (ver materiales y métodos). El tamaño de la misma, fue comprobado por su migración electroforética en un gel de agarosa, y la naturaleza del ácido nucléico fue corroborada sometiendo al producto recién sintetizado a tratamiento con la enzima DNasa RQ1; el transcrito no sufrió ninguna alteración, como era de esperarse si se trataba de una molécula de RNA (ver figura 3).

La secuencia del cDNA que se empleó para sintetizar a la ribosonda de 378b, comprende parte de la secuencia de los repetidos terminales largos (LTR), y a una región del gene nef. Esta secuencia se eligió porque se sabe que se encuentra presente en los tres RNA mensajeros detectados hasta la fecha en células infectadas con el VIH 1; (el transcrito más pequeño, de un tamaño de 2.0Kb se encuentra presente durante las etapas tempranas de la infección, mientras que los de 4.3 y 9.2 Kb se presentan durante las etapas

tardias). El uso de esta ribosonda, nos aseguraba el poder detectar la presencia de secuencias virales independientemente del estadio de infección en la célula.

Cuando sintetizamos la ribosonda de 378b, se obtuvo una actividad específica del orden de 2×10^6 cpm/ μ g de RNA. Esta incorporación es importante, sobretodo en aquellos ensayos de hibridación en los que el material que se desea detectar se encuentra en bajas concentraciones, como sucede en la infección con el VIH 1, durante la cual existen muy pocas células infectadas, y en ellas, el número de partículas virales es muy bajo (Abbas, A.K. y cols. 1991).

En los casos de la síntesis de las ribosondas con secuencias tanto del virus de la poliomielitis como del dengue, la estrategia de construcción fue similar.

La ribosonda para la detección de secuencias del virus de la poliomielitis, tiene un tamaño de 221b y comprende la secuencia que codifica a la proteína VP2, que se encuentra altamente conservada en los tres serotipos del virus de la poliomielitis. Esta, al ser sintetizada en presencia de α UTP P^{32} presentó una actividad específica de 2.3×10^6 cpm/ μ g de RNA.

En el caso de la construcción de las ribosondas para la detección de secuencias del virus del dengue, una de ellas se obtuvo a partir del plásmido pGEM 30, con una longitud de 1134b y a pesar de su gran tamaño presentó una buena actividad específica (del orden de 2.5×10^6 cpm/ μ g de RNA). La segunda ribosonda construida para la detección de secuencias del virus del dengue se

derivó del plásmido pDE, con una longitud de 314b y una actividad específica del orden de 2.0×10^6 cpm/ μ g de RNA.

DETECCION DE SECUENCIAS DEL VIH 1 MEDIANTE EL USO DE RIBOSONDAS.

Para evaluar la capacidad de la ribosonda de 371b en la detección de secuencias del VIH 1 en células infectadas, se aisló el RNA total de células infectadas y no infectadas, y se fijó a papel de nitrocelulosa mediante la técnica de transferencia tipo franja (ver materiales y métodos). En un primer ensayo de hibridación con concentraciones crecientes de RNA (1, 2 y 5 μ g), la ribosonda fue capaz de detectar la presencia del VIH 1 en células infectadas desde la menor concentración utilizada y la señal de hibridación fue aumentando a medida que aumentaba la cantidad de RNA en cada ensayo (ver figura 5-A). En la figura 5-B, puede observarse que a medida que aumentó la cantidad de extracto utilizado, aumentó claramente la señal de hibridación. De manera sorprendente, en las zonas del papel correspondientes a los extractos totales de RNA provenientes de células no infectadas, se detectó hibridación de baja intensidad, que a pesar de provenir de tres diferentes concentraciones de extracto, permanecieron más o menos constantes (figura 5-A). Cabe hacer notar que la intensidad de emisión de dichas bandas fue mucho menor que la mínima concentración de RNA proveniente de células infectadas utilizada, lo cual puede observarse directamente en la autorradiografía de la figura 5-A, o en la gráfica de la misma figura.

Para corroborar nuestro primer resultado, se llevó a cabo una segunda transferencia tipo franja, con concentraciones de 1, 2, 3, 5 y 6 μg de RNA total proveniente de células infectadas con el VIH 1 (HTLV IIIb). En este resultado, se obtuvo nuevamente un aumento en la emisión de la señal a medida que la cantidad de RNA utilizado iba aumentando, salvo en las dos concentraciones mayores en donde las señales se observan más o menos iguales, probablemente por una saturación del sistema. En cuanto a los extractos de RNA total provenientes de células no infectadas, tanto en la muestra de menor como en la de mayor concentración, la intensidad de las bandas es semejante, repitiéndose nuevamente los resultados del ensayo anterior. En este mismo ensayo de transferencia, se analizaron extractos de RNA provenientes de células infectadas con el VIH 1 heterólogo (Mn), en donde a pesar de haber utilizado las mismas concentraciones de las muestras de RNA provenientes de células infectadas con el VIH 1 (HTLV IIIb), la hibridación aparece ligeramente mas tenue. Este resultado puede explicarse en términos de que la ribosonda utilizada no es del todo homóloga para el tipo de virus VIH 1 (Mn). A pesar de ello, la emisión de señal en la menor concentración utilizada de las muestras de RNA de células infectadas es mayor a la señal que se obtiene con la mayor concentración de RNA de células no infectadas. Para saber si la señal que detectamos en las muestras de RNA proveniente de células no infectadas era debido a una hibridación cruzada con secuencias de origen celular, (ya que en otros laboratorios se han reportado hibridaciones cruzadas con secuencias de RNA ribosomal), decidimos

separar los RNA mensajeros del resto de la población de RNAs. Esto se llevó a cabo mediante la técnica de extracción de RNA poli A+ (ver materiales y métodos), con la cual podemos separar la fracción que contiene a los RNAs mensajeros tanto celulares como virales, de la fracción de RNA poli A-, en donde se encuentran los RNA de transferencia y ribosomales. Los extractos de RNA total, las fracciones de RNA poli A+ y las de RNA poli A- fueron analizadas en un ensayo de transferencia tipo franja, (ver figura 7). Los resultados obtenidos en este ensayo, muestran que el RNA total proveniente de células infectadas (en concentraciones de 0.5 y 1.0 μg), presenta señales de hibridación crecientes, en relación a la cantidad de muestra, (resultados similares a los obtenidos en los ensayos anteriores). La hibridación observada con los extractos de RNA total provenientes de células no infectadas, es más tenue y se mantiene más o menos en la misma intensidad a pesar de la diferencia de concentración.

A diferencia de lo que sucede con el RNA total, las muestras que corresponden a 0.5 y 1.0 μg de RNA poli A+ proveniente de células infectadas mostraron una señal de hibridación muy clara e incluso mayor a la obtenida con la misma concentración de RNA total de células infectadas, sin embargo en las muestras de RNA poli A+ provenientes de células no infectadas, no detectamos ninguna señal de hibridación. Cabe hacer notar que la señal emitida con las muestras de RNA Poli A+ es mayor que la proveniente del RNA total proveniente de células infectadas, lo que ocurre debido a que con la purificación se enriquece la población del RNA mensajero, y por

lo tanto del RNA mensajero viral.

En cuanto a los extractos de RNA poli A- provenientes tanto de células infectadas como de células no infectadas, existe una señal de hibridación que se mantiene más o menos constante, a pesar de ser de dos concentraciones diferentes (0.5 y 1.0 μg) de extractos infectado y control.

Estos resultados, nos sugieren que probablemente las señales detectadas se debían a hibridaciones cruzadas de la ribosonda con el RNA ribosomal. Para comprobar lo anterior, las mismas muestras fueron analizadas en un ensayo de transferencia tipo Northern (ver figura 8). En este tipo de ensayos, los RNAs son separados de acuerdo a su tamaño, por lo tanto, podemos saber el peso molecular del RNA detectado. En los carriles 2 y 3 se colocaron muestras de RNA total proveniente de células infectadas y no infectadas respectivamente. La hibridación, se detecta en dos bandas de aproximadamente 4.3 y 2.0 Kb, que corresponden por tamaño a las bandas reportadas de los RNA ribosomales de 28 y 18S. En los carriles 4 y 5, se colocaron las muestras de RNA poli A+ de células infectadas y no infectadas respectivamente. En el primer caso, se detectaron dos bandas de los mismos tamaños que en los dos casos anteriores, mientras que en el carril 5, (RNA poli A+ de células no infectadas) no existe hibridación detectable con nuestra ribosonda. Es de extrañar que en el caso de la hibridación con el RNA poli A+ proveniente de células infectadas, se detecten dos bandas que comigran por tamaño con los RNA ribosomales a pesar de que ambos se habían separado previamente mediante la metodología de RNA poli A+.

La hibridación con estos RNAs puede explicarse ya que dos de los tres transcritos del VIH, son al igual que los RNA ribosomales, de un tamaño de 4.3 y 1.9Kb.

Todos los datos anteriores nos llevan a sugerir que la detección de secuencias del VIH 1 con ribosondas, requiere primeramente la separación de los RNA mensajeros, y posteriormante la detección en un ensayo de transferencia en franja. En la figura 9, podemos observar una transferencia tipo franja con muestras de RNA total y Poli A+ de células infectadas y no infectadas, en donde se observa que en los extractos de RNA poli A+, existe una notable diferencia entre los provenientes de células infectadas y las que no lo están, diferencia que no se observa tan claramente en los resultados de los extractos de RNA total. Estos resultados corroboran nuevamente los obtenidos en los ensayos anteriores.

La necesidad de utilizar la metodología de RNA poli A+, nos confiere la posibilidad de poder limpiar el sistema que inicialmente nos daba señal de hibridación con los extractos de RNA total provenientes de células no infectadas. Sin embargo, este sistema es complicado para ser utilizando como metodología rutinaria en la detección de una infección con el VIH 1, aunque puede serlo en los casos en los que se necesite un diagnóstico confirmatorio, sobretodo cuando el resultado obtenido a través del uso de otras metodologías es dudoso. Esta ribosonda, puede tener una utilización en ensayos implicados en el estudio de la regulación viral, ya que para ello se cuenta con una infraestructura con la cual podemos aplicar metodologías más

sofisticadas que las que se requieren en los ensayos rutinarios de diagnóstico.

Por otro lado, el uso de ribosondas en la detección de secuencias del VIH 1, puede ser de gran utilidad en el caso de acoplarse a metodologías como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en donde el número de copias de las secuencias del VIH 1 se ve aumentado considerablemente, pudiendose por un lado comprobar con la ribosonda que el segmento amplificado es realmente una secuencia viral, y por otro, poderse llevar a cabo la hibridación sin problemas de que se presente hibridación cruzada con secuencias de origen celular, o detección de señales débiles debido a las pocas copias que se encuentran en las células infectadas.

Pensamos que la hibridación cruzada pudiera deberse a que la ribosonda posee secuencias regulatorias (parte del LTR) que podrían compartir regiones de homología con las secuencias regulatorias celulares.

DETECCION DE SECUENCIAS DEL VIRUS DE LA POLIOMIELITIS MEDIANTE EL USO DE RIBOSONDAS.

La ribosonda que fue capaz de detectar secuencias del virus de la poliomiélitis, fue sintetizada a partir del plásmido pGEM4Z-Vp2. El transcrito obtenido fue de un tamaño de 221b.

La detección de secuencias del virus de la poliomiélitis se llevó a cabo en extractos de RNA total obtenidos a partir de 6

diferentes tipos de metodología (descrita en el capítulo de materiales y métodos). Estas metodologías fueron escogidas por su simplicidad, con el objeto de obtener resultados satisfactorios con la menor complicación posible.

Como puede observarse en ambas autorradiografías, existe una evidente señal de hibridación en los pozos en donde se colocaron los extractos de RNA proveniente de células infectadas (I) independientemente del tipo de metodología de extracción, a diferencia de los pozos de las muestras provenientes de células no infectadas (C) en donde no existe ninguna hibridación, incluso cuando la autorradiografía se sobreexpuso. Cabe hacer notar, que a pesar de que esta diferencia entre los extractos provenientes de células infectadas y no infectadas son sumamente claros, con la metodología N-P-A, existe una mayor detección de secuencias virales, seguida de la metodología N-Ac, lo que puede deberse posiblemente a que con ellas las moléculas de RNA se encuentran más limpias, permitiendo una mejor hibridación entre la ribosonda y el RNA viral.

Para corroborar que las secuencias detectadas mediante el ensayo de transferencia tipo franja eran realmente secuencias virales, el RNA proveniente de células infectadas y no infectadas fue extraído mediante la metodología de N-P-A y sometido a un ensayo de transferencia tipo Northern. Los resultados de este ensayo pueden observarse en la figura 12 en donde tenemos en el inciso A una fotografía de dicho gel. En el carril 1, se colocaron muestras de RNA provenientes de células no infectadas, en el carril

2, muestras de RNA de células infectadas, y en el carril 3 marcadores de peso molecular. Como puede observarse, en los dos primeros carriles se emplearon cantidades iguales de muestra.

En el inciso B, se observa la autorradiografía de la transferencia del gel del inciso A, en donde se observa una banda de aproximadamente 7.5Kb en el carril 2 que es donde migró el RNA de células infectadas. Esta banda corresponde en tamaño al reportado en la literatura como RNA mensajero del virus de la poliomielitis.

La ribosonda que se construyó para la detección de secuencias del virus de la poliomielitis, no presenta hibridación cruzada con secuencias celulares, y es posible obtener resultados con el uso de la metodología más sencilla de extracción.

La clara detección de las secuencias del poliovirus, puede deberse en cierta manera, a diferencia de lo que ocurre con el VIH 1, a que este virus se replica de manera muy rápida y eficiente, por lo que en las células infectadas existen una gran cantidad de secuencias virales que pueden detectarse desde las primeras horas de la infección.

DETECCION DE SECUENCIAS DEL VIRUS DEL DENGUE MEDIANTE EL USO DE RIBOSONDAS.

Para la detección de secuencias del virus del dengue se construyó el plásmido pGEM 30 a partir del cual se sintetizó una ribosonda de 1134b. Esta ribosonda se utilizó en los ensayos de hibridación con RNA extraído de células infectadas y no infectadas

que fue fijado a papel mediante la técnica de transferencia tipo franja. Los resultados de ésta hibridación pueden observarse en la autorradiografía de la figura 15, en donde tenemos muestras por duplicado. En ella, se muestran extractos de RNA provenientes de células infectadas (I), y células no infectadas (C) obtenidos a las 24, 48 y 72 horas postinfección. En todos los extractos provenientes de células infectadas se obtuvieron señales de hibridación, y es en el extracto obtenido a las 48 horas en donde esta señal se presenta más fuertemente. En los extractos obtenidos a partir de células no infectadas, al igual que en los casos de hibridación con la ribosonda de VIH 1, se detecta una señal tenue en los tres casos, que permanece más o menos constante a pesar de las diferencias que se presentan en las células infectadas y extraídas a diferentes tiempos.

Este resultado, nos hizo sospechar que nuevamente se trataba de una hibridación con secuencias de origen celular, específicamente secuencias de RNA ribosomal que eran detectadas por la ribosonda mediante hibridación cruzada.

En la autorradiografía de la transferencia tipo Northern de la figura 18 se puede observar que existe una hibridación cruzada muy fuerte con las secuencias de RNA ribosomal tanto en RNA proveniente de células no infectadas como en el de las infectadas, y es en éste último en el que se detecta también una banda tenue de aproximadamente 10.5Kb que corresponde en tamaño al RNA mensajero del virus del dengue que no se presenta en los extractos provenientes de células no infectadas.

Como es bien sabido, el RNA mensajero del virus del dengue, a diferencia de la mayoría de los RNA mensajeros, no posee una región poliadenilada en el extremo 3' terminal, por lo que la estrategia metodológica utilizada para la separación de la población de RNA poli A+ de los RNA ribosomales no pudo ser aplicada en este caso.

Dado que la ribosonda utilizada para la detección de secuencias del virus del dengue era de un tamaño considerablemente grande (ya que queríamos detectar con ella a cualquiera de los serotipos del virus del dengue), se decidió construir una ribosonda más pequeña, de una zona del cDNA con la cual pudieramos detectar una región del virus del dengue compartida entre los 4 serotipos, y al mismo tiempo reducir la posibilidad de obtener hibridación cruzada debido al gran tamaño de la ribosonda.

La nueva ribosonda fue sintetizada a partir de un plásmido derivado del pGEM 30, llamado pDE, cuya construcción se describe en materiales y métodos. Esta, posee una región de la proteína E que se reporta como conservada entre los 4 serotipos del virus del dengue, y fue utilizada en un ensayo similar al anterior, con el fin de poder comparar los resultados. Este ensayo puede observarse en la autorradiografía de la figura 17, en donde podemos notar que los resultados fueron similares a pesar de que la ribosonda es totalmente diferente.

En el caso de utilizar las ribosondas para la detección del virus del dengue, al igual que con las del VIH 1, sería conveniente acoplarlas a sistemas como la PCR, en donde la detección de secuencias virales amplificadas incrementa las posibilidades de

detección de secuencias de hibridación y por el otro evita la
detección con secuencias de origen celular.

CONCLUSIONES

Los virus constituyen uno de los grupos de agentes patógenos más importantes a nivel mundial y son causantes de un sinnúmero de enfermedades en el humano.

La mejor manera de controlar la diseminación de este tipo de enfermedades es a través de la prevención. Sin embargo, una vez establecida la infección, es el diagnóstico temprano el que tiene un papel muy importante en la reducción de la propagación de una enfermedad determinada.

En este trabajo se plantea el uso de ribosondas como una alternativa de diagnóstico temprano de algunas infecciones virales como lo son la poliomielitis, el dengue y el SIDA, que representan un importante papel en terminos de salud a nivel mundial.

Durante la realización de este trabajo pudimos darnos cuenta que a pesar de que los tres virus causantes de las enfermedades anteriormente mencionadas tienen como material genético una molécula de RNA de polaridad positiva, la detección de las secuencias virales en los sistemas celulares se comportó de manera muy diferente.

En el caso del VIH 1 tuvimos que recurrir al aislamiento de las poblaciones de RNA Poli A+ (en donde se encuentran los RNA mensajeros) de las de RNA ribosomal y de transferencia, ya que probablemente algunas de las secuencias de la ribosonda, que corresponden a regiones promotoras virales, tuvieron hibridación

cruzada con los RNA ribosomales (tal vez con algunas secuencias regulatorias presentes en ellos).

El uso de esta metodología, además de evitar la hibridación de la ribosonda con secuencias de origen celular, nos permitió enriquecer la población de RNAs mensajeros del VIH 1, ya que ésta se encuentra en muy baja proporción con lo que la hibridación con las secuencias virales obtenida se presentó de una manera clara y específica.

A pesar de que es un buen sistema, se requiere el manejo de técnicas sofisticadas, que deben de ser realizadas en laboratorios especiales con costos elevados. Sin embargo, la sensibilidad y relativa rapidéz con las que se obtienen los resultados hace que este sistema pueda ser utilizado como un método confirmatorio, como lo es el "Western blot", cuyos requerimientos en cuanto a infraestructura, tiempo y costo son similares. .

Es importante hacer notar que el uso de ribosondas confiere, a diferencia de otros métodos de diagnóstico, la posibilidad de detectar una infección temprana, con lo que podemos tomar las medidas de prevención necesarias antes de lo que se logra mediante las metodologías tradicionales.

En el caso del uso de ribosondas para detectar secuencias del virus de la poliomielitis, los resultados fueron muy claros, utilizando metodologías muy sencillas y rápidas. La ribosonda para la detección de secuencias del poliovirus no tuvo reacción cruzada con secuencias celulares, y las señales de hibridación fueron bastante buenas, tal vez debido a la alta replicación de este

virus. Para este caso en particular, la detección fue sensible, y puede usarse en la detección de secuencias virales en muestras con cantidades mínimas de virus, como son los sueros de pacientes o las aguas residuales y desechos sólidos.

Con respecto a los resultados obtenidos en la detección de secuencias del virus del dengue, podemos decir que fueron similares a los obtenidos para el VIH 1. Sin embargo, en este caso no se pudo eliminar la hibridación cruzada que también se presentó con estas ribosondas debido a la imposibilidad metodológica de separar los mensajeros virales del resto de la población. Aunque la diferencia entre los ensayos con células infectadas y no infectadas es clara, es necesaria la utilización de otro tipo de metodología acoplada a este sistema para obtener resultados satisfactorios, como lo sería la amplificación de las secuencias virales, lo cual puede ser realizado mediante la técnica de la PCR, y posterior reconocimiento con las ribosondas específicas.

Es de llamar la atención que los tres virus utilizados para la elaboración de ribosondas como método diagnóstico, a pesar de tener tantas similitudes, desde el punto de vista de estructura genómica, tuvieran un comportamiento tan diferente. Si bien, la metodología no confirió todas las ventajas que esperábamos, pensamos que es una alternativa de diagnóstico que debe tomarse en consideración, sobre todo en aquellos casos en los que se necesite ratificar un resultado dudoso.

Tomando en cuenta que los ensayos fueron realizados a partir de líneas celulares, consideramos la necesidad de probar la

eficiencia de detección con las ribosondas para la detección del virus de la poliomielitis y de VIH 1 en sueros de pacientes. Para el caso específico de la detección del virus del dengue, sería conveniente diseñar y construir ribosondas de otras regiones del genoma, para tratar por un lado de evitar la hibridación cruzada con secuencias celulares, y otro poder discernir entre los 4 diferentes serotipos del dengue.

APENDICE

SOLUCIONES AMORTIGUADORAS

MEDIO Ua

0.5% de bactoextracto de levadura, 2.0% de Bactotripton, 0.5% de sulfato de magnesio ajustado a pH de 7.6 con hidróxido de potasio. Filtrar a través de una membrana millipore de 0.45 mm. Añadir 1.4% de bactoagar y esterilizar en autoclave.

MEDIO TFb 1.

30 mM de acetato de potasio, 100 mM de cloruro de potasio, 10 mM de cloruro de calcio, 50 mM de cloruro de magnesio, 15% de glicerol. Ajustar el pH a 5.8 con ácido acético 0.2 M y esterilizar por filtración.

MEDIO TFb 2.

10 mM de MOPS, 75 mM de cloruro de calcio, 10 mM de cloruro de potasio, 15% de glicerol. Se ajusta a pH 6.0 con hidróxido de sodio. Esterilizar por filtración.

MEDIO MAC B AMP.

4.0% de medio Macconkey, 1.0 % de Lactosa, 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ampicilina.

\MEDIO LURIA.

1% de bactoextracto de levadura, 0.5% de bactoextracto de levadura, 1% de cloruro de sodio. Ajustar a pH 7.5 con hidróxido de sodio y

adicionar el antibiótico de selección (ampicilina 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

SOLUCION AMORTIGUADORA STET.

8% de sacarosa p/v, 0.1% de Tritón X 100 v/v, 50 mM de EDTA, 50 mM de tris-HCl pH 8.0.

SOLUCION TRITON-TOLUENO.

1:0.6 tolueno-Tritón X 100 v/v, 168 de agua bidestilada, 0.18% p/v de PPO).

SOLUCION FBS.

0.8% de cloruro de sodio, 0.02% de cloruro de potasio, 0.115% de fosfato de sodio, 0.02% de fosfato de potasio. Ajustar a pH 7.4 y esterilizar en autoclave.

SOLUCION DE ISOTIOCIANATO DE GUANIDINA.

4M de ITCG, 20 mM de acetato de sodio pH 5.2, 0.1 mM de DTT, 0.5% de Sarkosyl.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE CARGA ESTERIL.

1M de cloruro de sodio, 40 mM de Tris-HCl pH 7.5, 2mM de EDTA pH 7.5.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE CARGA ESTERIL CON SDS.

Preparar de la misma manera que la solución anterior y adicionar SDS a una concentración final de 10%.

SOLUCION AMORTIGADORA MOPS.

2.0 mM de MOPS pH 7.5. Ajustar con hidróxido de sodio, 4.7 mM de Tris-HCL pH 7.5, 1.0 mM de EDTA.

SOLUCION DENHARDT'S.

1% de Ficoll, 1% de albúmina sérica bovina, 1% de polivinilpirrolidina. Almacenar en pequeñas muestras y guardar en congelación.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE DESPEGADO.

40mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA pH 8.0, 150 mM NaCl.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE MUESTRA PARA DNA.

0.1% Xilencianol, 0.1% azul de bromofenol, 25% sacarosa, 0.5% SDS, 2.5X amortiguador TBE.

El resto de los reactivos utilizados se mencionan a lo largo de la metodología.

BIBLIOGRAFIA

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., y Pober, J.S. (1991). Cellular and molecular immunology. Ed. Saunders. N.Y. 378-397.

Ahmed, R., y Stevens, J.G. (1991). Viral persistence. En: Virology. Raven Press Ltd. N.Y. 2da. ed. 1:241.

Almond, J.W. (1987) The attenuation of Poliovirus neurovirulence. Annual Review of Microbiology.41: 153-180.

Ausubel, F.M., Brenet, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J.G., Smith, J.A., y Struhl, K. (1991). Current protocols in molecular biology. Ed. Wiley interscience. N.Y. 1:4.9.6, 16.8.9.

Cajero, M. (1992). Asociación de proteínas celulares a la región no traducida 5' de Rhinovirus humano 14. Tesis de Maestría. CINVESTAV-IPN.

Camarena, L.R., y Fernández-Tomás, C. (1987). Los virus. En: Teorías y hechos sobre la vida. Ed. Consejo Nacional de fomento educativo, SEP. México, D.F. 167-198.

Cheng-Mayer, C. y Levy, A. (1990). Human Immunodeficiency Virus infection of the CNS. Characterization of neurotropic strains.

Current Topics in Microbiology. 160:145-155.

Chiwing, J.M., Przbyla, A.E., Raymond, J., MacDonald, J., y Rutter, J. (1979). Isolation and biologically active ribonucleic acid form sources enriched in ribonuclease. Biochemistry. 18:5294-5299.

Cova, L., Kopecka, H., Aymard, M., y Girard, M. (1988). Use of cRNA probes for the detection of enteroviruses by molecular hybridization. Journal of Medical Virology. 24:11-18.

Cuello, A. 1983. Immunohistochemistry. Jhon Wiley and sons. NY. pp 24-27.

Cullen, B.R., y Greene, W. (1989). Regulation pathways governing HIV-1 replication. Cell. 58:423-426.

Cullen, B.R., y Greene, W.C. (1990). Functions of the auxiliary gene products of the Human Immunodeficiency virus type 1. Virology 178:1-5.

Cullen, B.R. (1991). Human immunodeficiency virus as a prototypic complex retrovirus. Journal of Virology. 65:1053-1056.

Cullen, B.R. (1991). Regulation of gene expression in the Human Immunodeficiency virus type 1. Advances in Virus Research 40:1-17.

Del Sal, G., Monfioletti, G., y Schneider, C. (1988). A one-tube DNA mini-preparation suitable for sequencing. *Nucleic Acid Research*. 16:20, 9878.

Emmons, R.W., y Riggs, J.L. (1977). Application of immunofluorescence to diagnosis of viral infections. En *Methods in Virology*. Academic Press, N.Y. VI:1-26.

Engevall, E., y Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobuline G. *Immunohistochemistry*. 8:871-874.

Epidemiological Bulletin. (1992). Panamerican Health Organization. 13:1-8.

Evans, A.S. (1976). Viral infections of humans epidemiology and control. Plenum Medical Book Company. N.Y. 22-23.

Faure, M., Dupouey, P., y Morelec, M.J. (1977). Techniques de base. Les techniques de l'immunofluorescence et les reactions immunoenzymatiques. En *Cours de l'Institut Pasteur*. Maloine S.A. Editeur. Paris. 4ta. ed. 1-38.

Feldmann G., Druet, P., Bignon, J. y Aurameas, S. (1975). Immunoenzimatic techniques. *Inserm symposium 2*. North Holland

Publishing company. Holland. 169-175.

Fenner, F., y White, D. (1974). Medical virology. Academic Press. N.Y. 3-4.

Fields, B.N., y Knipe, D.M.(1990). Virology. Raven Press Ltd N.Y. 1:3-5.

Gartnet, S., y Nikulas Popovic. (1990). Virus isolation and production. En: Techniques in HIV research. Ed. Mac Millan publisher LTD. N.Y. 66-71.

Greene, W.C. (1991). The molecular biology of the HIV infection. The New England Journal of Medicine. 324: 308-317.

Goodheart, C. (1969). Replication of viruses that contain RNA. En:An Introduction to Virology. WB Saunders Company. N.Y. 199-226.

Griffith, B. (1989). Acute Human Immunodeficiency Virus infection: false-negative ELISA in a patient with viremia and a positive Western blot test. The Journal of Infectious diseases 160:1, 160-162.

Halstead, S.B. (1977). Dengue virus and mononuclear phagocytes. II. Identity of blood and tissue leukocytes supporting "in vitro" infection. Journal of Experimental Medicine 146, 218-229.

Halstead, S.B. (1988). Pathogenesis of Dengue: Challenges to molecular biology. *Science* 239: 479-481.

Halstead, S.B. (1989). Dengue. En: Tropical and Geographical Medicine. McGraw Hill. 2a. ed. 675-685.

Henchal, E.A., Polo, S.L., Vorndam, V., Yaemsiri, C., Innis, B.L. y Hoke, C.H. (1991). Sensitivity and specificity of a universal primer set for the rapid diagnosis of dengue virus infections by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 45:418-428.

Ho, D.D., Pomerantz, R.J., y Kaplan, J.C. (1987). Pathogenesis of infection with Human Immunodeficiency virus. *The New England of Medicine* 317:278-286.

Kacian, L. D. (1977). Methodology for assaying reverse transcriptase. *Methods in Virology*. Academic Press, N.Y. 143-181.

Kools, A. M. (1992). Hepatitis A, B, C, D and E. Update on testing and treatment. *Postgraduate medicine*. 91: 109-114.

Lawson, A. M., y Semler, B.L. (1990). Picornavirus protein processing enzymes, substrates and genetic regulation. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 161:49-87.

Luciw, P. A., y Steimer, S.K. (1989). HIV detection by genetic engineering methods. Ed. Marcel Dekker, Ink. N.Y. 1-8.

Martínez, A.C., Hera, A., Alonso, J., Marcos, M. Márquez, C., y Toribio, L. (1988). Immunological consequences of HIV infection: Advantage of being low responder casts doubts on vaccine development. The Lancet 454-420.

Matthews, F.E. (1982). Classification and nomenclature of viruses: 40. report of the international committee on taxonomy of viruses. Ed. Kergen.

McIntosh, K. (1991). Diagnostic Virology. En Virology. Raven Press Ltd. N.Y. 2da. ed. 1:419-420.

Mendell, G.L., Douglas, G., y Bennett, J.E. (1979). Principles and practice of Infectious diseases. Ed. Jhon Wiley and Sons. N.Y. pp 2:1079-1082.

Melnick, J. L. (1983). Portraits of viruses: the picornaviruses Intervirology 20:60-100.

Melton, D.A., Krieg, M.R., Rebagkuati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K., y Green, M.R. (1984). Efficient "in vitro" synthesis of biological active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. Nucleic Acid Research.

Monath, T.P. (1990). Flaviviruses. En Virology. Raven Press Ltd. N.Y. 2da. ed. 1:797-805.

Pinheiro, F. (1989). El dengue en las américas. Boletín epidemiológico. Organización Panamericana de la Salud. 10:1-8.

Pomerantz, R., Trono, D., Feinberg, M., y Baltimore, D. (1990). Cells nonproductively infected with HIV-1 exhibit an aberrant pattern of viral RNA expression: a molecular model of latency. Cell 61, 1271-1276.

Ramos, C. (1989). Biología de la infección causada por el virus del Dengue. Salud Publica Mexicana 32:54-72.

Rayfield, M., Cock, K., Heyward, W., Goldstein, L., Krebs, J., Kowk, Sh., Lee, S., McCormick, J., Moreau, J.M., Odehouri, K., Schochetman, G., Sninsky, J., y Ou, C. (1988). Mixed Human Immunodeficiency virus (HIV) infection in an individual: demonstration of both HIV type 1 and type 2 proviral sequences by using polymerase chain reaction. The Journal of Infectious Diseases 158:1170-1176.

Retner, L., Haseltine, W., Petarca, R., Livak, K., Starcich, B., Josephs, F., Doran, E., Rafalski, A., Whitehorn, A., Baumeister,

K., Ivanoff, L., Petteway, R., Peterson, M., Lautenberger, A., Papas, T., Ghrayeb, J., Chang, N., Gallo, R., y Wong-Staal, F. (1985). Complete nucleotide sequence of AIDS virus HTLV III. Nature (London) 313:277-284.

Rey, M.A, Spire, B., Dormont, D., Barre-Sinoussi, F., Montagner, L., y Chermann, J.C. (1984). Characterization of the RNA dependent DNA polimerase of a New human T lymphotropic retrovirus (Lymphadenopathy associated virus) Biochemical and Biophysical reserach communications. 121:126-133.

Rice, C.M., Lenches, E.M., Eddy, S.R., Shin, S.J., Sheets, R.L., y Strauss, J.H. (1986). Nucleotide sequence of yelow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. Science 239:476-481.

Richards, O.C. , y Enrenfeld, E. (1990). Poliovirus RNA replication. Current topics in Microbiology and Immunology 161: 90-199.

Ross, B.C, Anderson, D.A. y Gust, D.I. (1991). Hepatitis A virus and Hepatitis A infection. En: Advances in virus reserach. Academic Press Inc. Cal. 39:209-253.

Russel, P., y Brandt, W. (1973). Immunopathologic Proceses and viral antigens associates with sequential dengue virus infection.

Persistent virus infections. En Perspectives in virology VIII.
Academic Press. N.Y. 14:263-275.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989). Molecular
Cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab Press.

Sarnow, S.J., Jacobson, S.J., y Najita, L. (1990). Poliovirus
genetics. Current Topics in Microbiology and Immunology. 161:155-
183.

Schleisinger, S. y Schlesinger, J. (1990). Replication of
tagoviridae and flaviviridae. En: Virology. Raven Press Ltd.
N.Y. 2da. ed. 1:697-711.

Stanway, G. (1990). Structure, function and evolution of
picornaviruses. Journal of General Virology. 71:2483-2501.

Trono, D., Andino, R., Baltimore, D. (1988). An RNA sequence of
hundreds of nucleotides at the 5' end of poliovirus RNA is involved
in allowing viral protein synthesis. Journal of Virology. 62:2291-
2299.

Tyler, K.L. y Fields, B.N. (1990) Pathogenesis of viral infections.
En: Virology. Raven Press Ltd. N. Y. 1:191-239.

Wingler, G., y Wingler, G. (1981). Terminal sequences of the

genome and replicative-form RNA of the flavivirus west Nile virus:
Absence of poli A and possible role in RNA replication. Virology.
113:544-555.

Weiss, R. (1982). RNA tumor viruses. Cold Spring Harbor
Laboratory. 375-393.

Wimmer, E., Kuhn, R.J., Pincus, S., Yang, C., Toyoda, H., Nicklin,
J.H., y Takeda, N. (1987). Molecular events leading to
picornaviruses genome replication. Journal of Cellular Science
Suppl. 7:251-276.